



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANA JACQUELINE CONCEIÇÃO SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA DE CULTIVO DE
ARROZ IRRIGADO**

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION
AGROCHEMICAL WASTE IN WATER FROM IRRIGATED RICE
CULTIVATION***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA JACQUELINE CONCEIÇÃO SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA DE CULTIVO DE
ARROZ IRRIGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

Coorientador: Prof. Dra. Débora Santos S. Bezerra

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINING
AGROCHEMICAL WASTE IN WATER FROM IRRIGATED RICE
CULTIVATION***

Master dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry



RESUMO

O arroz é uma das culturas mais importantes no mundo, e as águas próximas das áreas desta cultura possuem elevado risco de contaminação, já que o cultivo de arroz requer a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos. Devido à sua alta toxicidade, seu uso descontrolado e sua alta solubilidade em água, os agrotóxicos são considerados um dos principais poluentes dos ecossistemas aquáticos. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método eficiente baseado nas técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos (HPLC UV-Vis/DAD) para a determinação dos agrotóxicos deltametrina, epoxiconazol, piraclostrobina, piriproxifeno, tebuconazol e tiametoxan em água de cultivo de arroz irrigado. Para tanto, foram realizados testes para otimização das condições cromatográficas e do método de extração. Na etapa de extração dos agrotóxicos, o método foi otimizado utilizando adsorventes comerciais e alternativos. Quando se fez uso do adsorvente C-18, os melhores resultados foram obtidos utilizando 10 mL de acetona acidificado a pH 5,0 com solução de ácido fórmico, $69 \pm 0,5$ – $100 \pm 5,9$ %. Já quando o biocarvão produzido a partir de aguapé foi testado como adsorvente para a extração por SPE, apresentou resultados satisfatórios de recuperação entre $70 \pm 0,7\%$ – $122 \pm 10,7\%$ para os níveis de concentração 0,3 a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os métodos desenvolvidos se mostraram adequados para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de água. Assim, o método de extração utilizando o biocarvão de aguapé foi escolhido para ser validado, pois além de ser eficiente na extração dos agrotóxicos trata-se também de uma opção sustentável. Os parâmetros avaliados para a validação do método foram: linearidade e sensibilidade, mostrando-se boa resposta linear com coeficientes de determinação superiores a 0,9832 no intervalo de 0,025 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; seletividade, através de estudos de efeito matriz; e limites de detecção e quantificação no intervalo de 0,01 - $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, 0,04 - $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Água; Agrotóxicos; Arroz irrigado; SPE; HPLC UV-Vis/DAD; HPLC UV-Vis.

ABSTRACT

Rice is one of the most important crops in the world. The waters near the areas of this crop has a raised risk of contamination, once the cultivation of rice requires large quantities of pesticides. Due to their high toxicity, uncontrolled use and high solubility in water, pesticides are considered one of the main pollutants of aquatic ecosystems. This present work aims to develop an efficient method based on solid phase extraction (SPE) techniques and high performance liquid chromatography with spectrophotometric detector in the ultraviolet and visible region with diode array (HPLC UV-Vis/DAD) for determination pesticides deltamethrin, epoxiconazole, pyraclostrobin, pyriproxyfen, tebuconazole and thiamethoxan in irrigated rice water, using biochar of aguapé as an alternative adsorbent for SPE. For that, tests were carried out to optimize the chromatographic conditions and the extraction method. In the extraction stage of the pesticides, the method was optimized using the adsorbents C-18 and bio-carbon produced from aguapé. When the C-18 adsorbent was used, the best results were obtained using 10 mL of acidified acetone at pH 5,0 with formic acid solution, $69 \pm 0,5$ - $100 \pm 5,9\%$. However, when the biochar was tested as an adsorbent for SPE extraction, it presented satisfactory recovery results between $70 \pm 0,7\%$ and $122 \pm 10,7\%$ for the concentration levels 0,3 to $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The methods developed were suitable for the determination of pesticide residues in water samples. Thus, the method of extraction using the bio-pot of water was chosen to be validated, because besides being efficient in the extraction of pesticides, it is also a sustainable option. The parameters evaluated for the validation of the method were: linearity and sensitivity, showing good linear response with determination coefficients above 0,9832 in the range of 0,025 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; selectivity, through matrix effect studies; and limits of detection and quantification in the range of 0,01-0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,04-0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: Water; Pesticides; Irrigated rice; SPE; HPLC UV-Vis/DAD; HPLC UV-VIS.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A cultura do arroz irrigado	3
1.1.1	A necessidade de água no cultivo de arroz irrigado	4
1.1.2	Pragas que atacam o cultivo de arroz irrigado	5
1.2	Agrotóxico	6
1.3	Extração em fase sólida (SPE)	14
1.4	Adsorventes Alternativos.....	15
1.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	17
1.6	Validação do método analítico	18
1.7	Revisão da Literatura	20
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Reagentes.....	25
3.2	Equipamentos	26
3.3	Padrões certificados dos agrotóxicos.....	26
3.4	Preparo das soluções padrão dos agrotóxicos	26
3.5	Condições cromatográficas de análise dos agrotóxicos.....	26
3.5.1	HPLC- UV-Vis/DAD (Sistema Analítico)	26
3.5.2	HPLC UV-Vis (Sistema Semi-preparativo)	27
3.6	Procedimentos de extração dos agrotóxicos por SPE	28
3.7	Obtenção do biocarvão de aguapé	28
3.8	Limpeza da vidraria	29
3.9	Descartes dos reagentes	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

4.1	SISTEMA ANALÍTICO (HPLC UV-Vis/DAD)	30
4.1.1	Otimização das condições cromatográficas de análise	30
4.1.2	Seleção da fase móvel	31
4.1.3	Testes da composição da fase estacionária	32
4.1.4	Seleção dos comprimentos de onda de máxima absorção	36
4.2	SISTEMA SEMI-PREPARATIVO (HPLC UV-Vis)	39
4.3	Otimização do preparo de amostra na técnica SPE	43
4.3.1	Seleção do adsorvente	44
4.3.2	Seleção do volume do solvente na eluição	45
4.3.3	Seleção da proporção de solventes utilizados na eluição	47
4.3.4	Avaliação do ajuste de pH	47
4.3.5	Otimização empregando o biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo para SPE	49
4.4	Validação do método analítico	54
4.4.1	- Linearidade e Sensibilidade	54
4.4.2	- Seletividade não específica (efeito matriz)	57
4.5	Aplicação do método em amostra real	62
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS	64

Aos meus pais, Jorge e Ernestina, como
gradidão por todo incentivo e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado e fortalecido nas horas mais difíceis;

Ao Prof. Sandro Navickiene pela prestimosa orientação, ensinamentos e pela paciência durante a execução desse trabalho;

À minha coorientadora Débora Bezerra por todo o auxílio prestado;

À Fabrício por todo o ensinamento no desenvolvimento do trabalho;

Aos meus familiares pelo incentivo;

Aos meus colegas de mestrado e do LCP, Raphael, Jôse, Jeisi, Luiza, Edica, Priscila, pelo companheirismo e convívio agradável;

À Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química e Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Química pela transmissão de conhecimento e experiência;

A FAPITEC pelo apoio financeiro;

A todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho, agradeço sinceramente.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CV – Coeficiente de Variação

C-8 - Octil

C-18 - Octadecilsilano

DAD - Detector por Arranjo de Diodos

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FLU - Fluorescência

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA - Ingestão Diária Aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

LMR - Limite máximo de resíduos

MS - Espectrometria de Massa, do inglês Mass Spectrometry

MeOH - Metanol

r^2 - Coeficiente de determinação

RSD - *Relative Standard Deviation* (Desvio padrão relativo)

SPE - *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)

UV/Vis - Ultravioleta Visível

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Imagem ilustrativa da cultura do arroz irrigado. Fonte: [18]....	3
FIGURA 2	Fórmulas estruturais, nomes comerciais e científicos dos agrotóxicos selecionados. FONTE: ANVISA, 2016. [25].....	11
FIGURA 3	Etapas envolvidas na Extração em fase sólida (SPE). Fonte: Lucci, 2012 [52].....	14
FIGURA 4	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão dos agrotóxicos com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	31
FIGURA 5	Cromatogramas das análises obtidos por HPLC UV-Vis/DAD dos agrotóxicos em estudo na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando metanol:água e acetonitrila:água como composição da fase móvel.....	32
FIGURA 6	Perfil cromatográfico obtido por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução mista dos agrotóxicos determinados com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ usando a coluna a Synergi RP-80 Å.....	33
FIGURA 7	Cromatogramas das análises obtidos por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos estudados com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ usando a coluna Microsorb-MV-100 Å.....	34
FIGURA 8	Cromatogramas das análises obtidos por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com a coluna Kinetex-100 Å.....	35
FIGURA 9	Comparação dos cromatogramas das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com as colunas testadas, Synergi RP-80 Å, Microsorb-MV-100 Å e Kinetex-100 Å.....	36

FIGURA 10	Espectros de absorção indicando o comprimento de onda de máxima absorção dos agrotóxicos em estudo.....	37
FIGURA 11	Cromatogramas das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos comprimentos de onda selecionados utilizando como composição da fase móvel acetonitrila:água e a coluna Synergi RP-80 Å.....	38
FIGURA 12	Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos estudados com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos comprimentos de onda selecionados, 220 e 263 nm.....	40
FIGURA 13	Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 1.....	41
FIGURA 14	Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 2.....	41
FIGURA 15	Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 3.....	42
FIGURA 16	Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 4.....	43

FIGURA 17	Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água por SPE utilizando nível de fortificação de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 100 mL da amostra e volume de eluição de 6 mL.....	44
FIGURA 18	Recuperações obtidas para os agrotóxicos utilizando cartucho C-18 com diferentes volumes do solvente de eluição, nível de fortificação de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 100 mL da amostra.....	46
FIGURA 19	Valores de recuperação obtidos com diferentes proporções de solventes na eluição dos agrotóxicos com nível de concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	47
FIGURA 20	Influência da adição de solução de ácido acético na eficiência da extração dos agrotóxicos em estudo com nível de concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	48
FIGURA 21	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis/DAD dos brancos com 150 e 250 mg do biocarvão de aguapé e da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	49
FIGURA 22	Curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz obtidas das análises dos agrotóxicos em HPLC UV-Vis/DAD no intervalo de concentração de 0,025 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	55
FIGURA 23	Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD do extrato da amostra de água de arroz irrigado.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais insetos prejudiciais ao cultivo de arroz irrigado. Fonte: MAPA, ANVISA, 2016 [14, 25].....	5
Tabela 2	Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo. Fonte: ANVISA, EPA, Portaria MS N° 2914, OMS [8, 25, 45, 46].....	10
Tabela 3	Características físico-químicas dos pesticidas em estudo. Fonte: IUPAC, Pubchem 2016 [48, 50].....	13
Tabela 4	Determinação de agrotóxicos em águas ambientais empregando SPE utilizando adsorventes comerciais e alternativos.....	23
Tabela 5	Condições de análise otimizadas nos sistemas cromatográficos.....	27
Tabela 6	Gradientes de eluição para os sistemas cromatográficos Analítico e Semi- preparativo.....	28
Tabela 7	Características das colunas utilizadas.....	33
Tabela 8	Agrotóxicos determinados com seus respectivos tempo de retenção (T_r) e comprimento de onda (λ).....	38
Tabela 9	Gradientes de eluição desenvolvidos para o sistema semi- preparativo.....	40
Tabela 10	Gradientes de eluição testados no sistema semi- preparativo.....	42
Tabela 11	Recuperação por SPE dos agrotóxicos em água na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando diferentes massas do biocarvão como adsorvente.....	50

Tabela 12	Recuperações dos agrotóxicos por SPE na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg de biocarvão de aguapé como adsorvente em 500 mL da amostra em diferentes vazões.....	51
Tabela 13	Recuperações obtidas para os agrotóxicos por SPE utilizando biocarvão como adsorvente em diferentes solventes de eluição.....	53
Tabela 14	Equações da reta das curvas analíticas dos agrotóxicos estudados no extrato da matriz e no solvente e seus coeficientes de determinação (r^2).....	56
Tabela 15	Intervalos de concentrações, equações das retas, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os agrotóxicos.....	58
Tabela 16	Resultados de recuperação média (%) e coeficientes de variação (CV) para os três níveis de fortificação testados.....	59
Tabela 17	Resultados de coeficientes de variação (CV) para teste de precisão intermediária.....	60
Tabela 18	Limite de detecção e quantificação dos agrotóxicos em estudo.....	61

1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento fundamental para os seres vivos. É considerada um recurso estratégico por seus valores ecológicos, econômicos e sociais. O volume total de água no planeta terra é estimado em 1,4 bilhões de quilômetros cúbicos, em que 97% se encontram nos oceanos e mares e 3% estão presentes nos rios e lagos [1].

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), aproximadamente 70 % da água doce do planeta é utilizada na agricultura. A água é considerada um elemento básico na produção do cultivo de arroz irrigado, uma vez que são necessários aproximadamente 2.000 litros de água para produzir 1 kg de grãos com casca. Na maioria das vezes esta água é retirada de fontes, lagos, rios ou barragens e conduzida até as lavouras por meio de canais de irrigação [2].

As águas próximas às áreas de cultivo de arroz apresentam um alto risco de contaminação, pois o cultivo desse grão necessita do uso de grandes quantidades de agrotóxicos [3], que vêm sendo amplamente utilizados nas práticas agrícolas com o intuito de melhorar o rendimento das culturas e conter pragas [4].

O uso de agrotóxicos tem se destacado entre os métodos mais usados pelos produtores rurais com o intuito de compensar a perda de produtividade provocada pela degradação do solo e conter o aparecimento de doenças. No entanto, na maioria das vezes, essa utilização de agrotóxicos é realizada de maneira e em quantidades inadequadas [5]. A desinformação, juntamente com a ambição de alguns produtores agrícolas, tem acarretado sérios prejuízos para a população e para o ambiente [6].

No Brasil, a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelece limites máximos de resíduos (LMR) em água destinada ao consumo humano para alguns agrotóxicos, de forma a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra [7]. Já a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde,

dispõe sobre os procedimentos de controle da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade [8].

No entanto, na legislação ainda não há valores estabelecidos para o uso de agrotóxicos em água de cultivo de arroz irrigado. Dessa forma, é de fundamental importância desenvolver métodos rápidos e eficazes para determinação da concentração de agrotóxicos em matrizes de interesse ambiental, com a finalidade de fornecer dados científicos e subsídios para os órgãos competentes criarem formas de fiscalização e estabelecerem limites confiáveis para a população.

As determinações de agrotóxicos em água incluem uma etapa preliminar de preparo de amostra, a qual é fundamental para garantir a eficiência do processo analítico. O preparo da amostra a ser empregado depende das características dos analitos, das propriedades da matriz e da concentração dos analitos a serem determinados [9].

Entre as técnicas e métodos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em água, destaca-se a Extração em Fase Sólida (SPE). Essa técnica é comumente usada para extração de analitos semivoláteis e não voláteis em amostras líquidas. Destaca-se por apresentar elevada eficiência na recuperação dos analitos, alta seletividade e detectabilidade [10].

Aliada à técnica de extração em fase sólida está à cromatografia líquida de alta eficiência com detectores baseados na absorção da luz na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Esses detectores possuem ampla aplicação e permitem a identificação e análise qualitativa e quantitativa de analitos, presentes em matrizes complexas, que absorvem em comprimento de onda específico [9, 11].

Assim, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método simples, rápido e eficiente para determinação de resíduos dos agrotóxicos Deltametrina, Epoxiconazol, Piraclostrobina, Piriproxifeno, Tebuconazol e Tiametoxan em água de lavoura de arroz irrigado utilizando as técnicas de extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis/DAD.

1.1 A cultura do arroz irrigado

O arroz é uma planta da família das gramíneas, da classe *Oryza*, que apresenta cerca de vinte espécies, dentre as quais a *Oryza sativa* é a mais cultivada. No Brasil, quase 95% da população consome arroz e, portanto, trata-se de um integrante básico na alimentação dos brasileiros. Além de ter um elevado valor nutricional, é também uma excelente fonte de energia [12].

O cultivo de arroz se destaca entre os mais significativos na prática da produtividade agrícola mundial [13]. Trata-se do segundo cereal de maior cultivo no mundo, sendo o milho o único que consegue superá-lo. O Brasil encontra-se entre os dez maiores produtores mundiais de arroz com aproximadamente 12 milhões de toneladas colhidas [14, 15]. Essa produção é proveniente de duas formas de cultivo: irrigado e sequeiro. Da produção de arroz no Brasil, em torno de 75% da produção é arroz irrigado (Figura 1) [16]. A área cultivada com arroz irrigado no Brasil compreende aproximadamente 1,3 milhões de hectares por ano com uma produtividade média de 5.200 kg/ha, em que são produzidos 6,7 milhões de toneladas de arroz em casca [17].

Figura 1 - Imagem ilustrativa da cultura do arroz irrigado. **Fonte:** [18].



No estado de Sergipe, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) no seu 4º levantamento da safra 2015/16 estimou que a produção foi de 39,8 mil toneladas, e a produtividade média de 6.634 toneladas por hectare. Atualmente, no estado de Sergipe a rizicultura ocorre nos Perímetros Irrigados de Betume, Cotinguiba/Pindoba e região do Baixo São Francisco, que abrange

os municípios de Propriá, Telha, Cedro de São João, Neópolis, Japoatã, Ilha das Flores e Pacatuba [19].

O cultivo de arroz denota essencial valor na produção de renda e trabalho da mão de obra familiar no estado de Sergipe, no qual sobressaem as pequenas entidades produtoras. Os governos federal e estadual, através da Secretaria de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Irrigação de Sergipe (SEAGRI), Companhia de Desenvolvimento do Vale São Francisco (CODEVASF) e Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (EMDAGRO), incentivam a produção de arroz no estado, tanto com a prestação de assistência técnica, quanto com a distribuição de sementes selecionadas [19].

1.1.1 A necessidade de água no cultivo de arroz irrigado

Segundo Getirana et al. (2007) [20], a agricultura irrigada é a atividade humana que retém a maior fatia do total de água consumida no mundo. Na lavoura de arroz, a água é captada em lagos, rios e açudes e transportada até as plantações por canais de irrigação.

Essa água é essencial para o bom funcionamento do sistema da cultura de arroz. Desempenha um papel primordial na produção de arroz, pois além de interferir nas particularidades destas plantas, influencia também no controle de nutrientes do solo, na população e espécies de plantas daninhas, bem como na existência de algumas pragas e doenças [21].

O cultivo de arroz irrigado tem a necessidade de água no decorrer de toda sua duração. O volume de água fundamental para a irrigação do cultivo de arroz corresponde ao somatório de água necessário para saturação do solo, desenvolvimento da lâmina de água, evapotranspiração e restituição das perdas por percolação e por fluxo lateral [22, 23].

Atualmente, para suprir a necessidade de água para o cultivo do arroz irrigado, estima-se que venha sendo usado um volume de água médio de 8 a 10 mil m³/ha (vazão de 1,0 a 1,4 L s⁻¹ ha⁻¹) para um período médio de irrigação de 80 a 100 dias [21].

1.1.2 Pragas que atacam o cultivo de arroz irrigado

O arroz, como qualquer cultura agrícola, está sujeito a diversas condições do ambiente que, direta ou indiretamente, influenciam o rendimento, a qualidade e o custo de produção. Dentre estes fatores, destaca-se o ataque de pragas como insetos, moluscos, pássaros e plantas daninhas que causam efeitos nocivos no crescimento, desenvolvimento e produtividade. As plantas daninhas se destacam, já que o sistema de cultivo de arroz irrigado garante um habitat especial para a infestação [24]. A Tabela 1 apresenta as principais pragas que prejudicam o cultivo de arroz irrigado.

Tabela 1 - Principais insetos prejudiciais ao cultivo de arroz irrigado. **Fonte:** MAPA, ANVISA, 2016 [14, 25].

Nome científico	Nome comum
<i>Agrotis ipsilon</i>	Lagarta-rosca
<i>Chaetocnema sp.</i>	Pulga-do-arroz
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Lagarta-elasmo
<i>Gaeumannomyces graminis var. graminis</i>	Mal-do-pé
<i>Helodytes foveolatus</i>	Gorgulho-aquático
<i>Mocis latipes</i>	Curuquerê-dos-capinzais
<i>Ochetina sp.</i>	Ochetina
<i>Oryzophagus oryzae</i>	Bicheira-da-raiz-do-arroz
<i>Rhizoctonia oryzae</i>	Mancha-das-bainhas
<i>Rhizoctonia solani</i>	Queima-das-bainhas
<i>Rhopalosiphum rufiabdominale</i>	Pulgão-da-raiz
<i>Spodoptera eridania</i>	Lagarta-das-folhas
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lagarta-militar
<i>Tibraca limbativentris</i>	Percevejo
<i>Ustilaginoidea virens</i>	Falso-carvão-do-arroz

No entanto, com o intuito de controlar essas pragas e assim melhorar a produção agrícola, os produtores rurais vêm fazendo o uso constante de agrotóxicos. Contudo, a sua aplicação de forma incorreta pode contribuir para a ocorrência de danos à saúde humana e ambiental [26, 27].

1.2 Agrotóxico

De acordo com o Codex Alimentarius, um órgão subsidiário da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), agrotóxico é definido como sendo “qualquer substância que tenha como objetivo prevenir, destruir, atrair, repelir, ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejáveis de plantas ou animais durante a produção, estocagem, transporte, distribuição e processamento de alimentos, produtos agrícolas ou rações animais” [28].

A Legislação Brasileira no artigo 1º, inciso IV do Decreto nº. 4.074 de 2002 que regulamenta a Lei nº. 7.802 de 1989, define os agrotóxicos e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimulantes e inibidores de crescimento” [29].

O consumo de agrotóxico no Brasil tem aumentado continuamente e o país vem se destacando entre os maiores consumidores no mundo [30]. Dados de 2015 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) comprovam que a utilização de agrotóxicos é a segunda principal fonte de contaminação das águas no Brasil, sendo ultrapassado apenas pelos esgotos domésticos [15].

Segundo a EMBRAPA, o uso indevido de agrotóxico, pode, por meio do escoamento ou lixiviação, levar a sua retenção nas culturas e no solo e, assim, atingir águas superficiais e subterrâneas. Para minimizar os riscos de contaminações e os impactos negativos no ambiente, recomenda-se que, além de seguir as normas impressas nos rótulos dos agrotóxicos, são necessários alguns cuidados, dentre estes, escolher o agrotóxico correto para o organismo alvo, tendo em consideração o nível de infestação e local em que o produto será aplicado; usar o agrotóxico na dose recomendada; verificar as restrições de uso do agrotóxico e da área, e respeitar o período de carência [2].

O mau uso dos agrotóxicos pode oferecer riscos aos seres humanos, pois além de serem cancerígenos, podem causar alterações no DNA e defeitos em fetos [31]. Também podem causar irritações nos olhos e na pele, provocar doenças respiratórias e problemas sexuais, como impotência e esterilidade. No entanto, quando ingeridos em quantidades dentro dos valores de ingestão diária aceitáveis (IDA) não causará danos à saúde [25].

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com algumas particularidades, como por exemplo: quanto à espécie de organismo que se planeja proteger ou extinguir, quanto à toxicidade que estes proporcionam à saúde humana, quanto à estrutura química das substâncias ativas, quanto à origem e a forma de atuação destes, e ainda quanto às suas características físico-químicas [32].

Quanto ao organismo que se planeja proteger ou extinguir, pode-se mencionar os acaricidas que controlam os ácaros, bactericidas que combatem as bactérias, herbicidas que destroem plantas e ervas daninhas, fungicidas que são substâncias utilizadas para controlar o crescimento de alguns tipos de fungos, inseticidas que matam insetos, dentre outros [31].

A legislação brasileira, além de disponibilizar informações quanto a quantidade de agrotóxicos a ser utilizada, também exige que para a comercialização, o rótulo deve conter a cor equivalente à classe de sua toxicidade alertando sobre o perigo deste produto. A classe toxicológica I (rótulo vermelho) engloba os compostos considerados altamente tóxicos para os seres humanos; a II (rótulo amarelo) medianamente tóxicos; a III (rótulo azul) pouco tóxicos e a VI (rótulo verde), não tóxicos [29].

Em relação ao grupo químico dos agrotóxicos selecionados nesse trabalho, estão:

Azóis: são utilizados na agricultura e agentes antifúngicos em medicamentos humanos e veterinários. São subdivididos em: imidazóis e triazóis. Os imidazóis são substâncias químicas que possuem atividade antifúngica de amplo espectro, sendo ativos contra algumas bactérias, principalmente as gram-positivas. Os triazóis representam um novo grupo de

antifúngicos também de amplo espectro com excelente eficiência e toxicidade reduzida para mamíferos [33, 34].

Éter piridiloxipropílico: inseticida juvenóide, regulador de crescimento de insetos. Impedem que as formas jovens se transformem em adultos. Dentre estes pode-se citar, o piriproxifeno, apontado por pesquisadores como o principal responsável pela microcefalia, visto que o agrotóxico é utilizado no combate ao mosquito *Aedes aegypti* em reservatórios de água potável. No entanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso do agrotóxico na quantidade sugerida para inibir o crescimento de larvas em reservatórios não provoca danos à saúde [35, 36].

Estrobilurina: por causa de sua atividade de amplo espectro, representa uma das principais classes de fungicidas que são aplicados no controle de doenças de plantas. Além de serem bastante eficazes quando aplicadas preventivamente, também podem favorecer os aspectos bioquímicos e fisiológicos de plantas na falta de agentes patogênicos e dificultam a produção de energia dos fungos [37 - 39].

Neonicotinóides: uma classe de inseticidas derivado quimicamente da nicotina. Propicia o controle de pragas numa vasta diversidade de culturas, pois são solúveis em água e de fácil absorção pelas plantas. Por apresentar toxicidade baixa a mamíferos e alta a insetos, passou a ser a classe mais extensivamente utilizada de inseticidas [40, 41].

Piretróides: trata-se de uma classe de inseticidas sintéticos que têm sido amplamente utilizados devido à sua capacidade de amplo espectro e alta eficácia, para prevenir e combater insetos na agricultura moderna. Apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação [42, 43].

Dentre os agrotóxicos recomendados para o cultivo de arroz irrigado foram escolhidos para este trabalho os seguintes: deltametrina, epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol e tiametoxan. Foi incluído também o agrotóxico piriproxifeno, por ser colocado diretamente nos reservatórios de água potável nas cidades afetadas pelo surto da microcefalia [44]. A Tabela 2 compila

informações gerais e a Figura 2 apresenta as fórmulas estruturais dos agrotóxicos em estudo.

Tabela 2: Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo. **Fonte:** Portaria MS N° 2914, ANVISA, EPA, OMS. [8, 25, 45, 46].

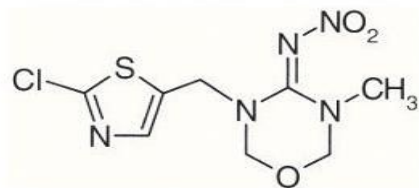
Agrotóxicos	Fórmula molecular	Classe química	Modo de ação	Classe toxicológica*	LMR ** (µg mL ⁻¹)
Tiametoxan	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	Neonicotinóide	Inseticida	III	0,0006 ⁺
Tebuconazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida	IV	0,18 ⁺⁺
Epoiconazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	Triazol	Fungicida	III	NE
Piraclostrobina	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	Estrobilurina	Fungicida	II	NE
Piriproxifeno	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	Éter piridiloxipropílico	Inseticida	IV	0,3 ⁺⁺⁺
Deltametrina	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	Piretróide	Inseticida	III	NE

Onde: NE = não encontrado. LMR = Limite máximo de resíduo.

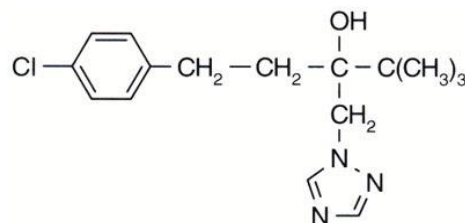
*Classificação Toxicológica: I - Extremamente Tóxico; II - Altamente Tóxico; III - Mediamente Tóxico; IV - Pouco Tóxico;

** LMR estabelecidos em água para consumo humano, ⁺EPA; ⁺⁺Portaria MS N° 2914; ⁺⁺⁺OMS.

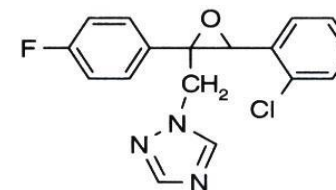
Figura 2: Fórmulas estruturais, nomes comerciais e científicos dos agrotóxicos selecionados. **FONTE:** ANVISA, 2016 [25].



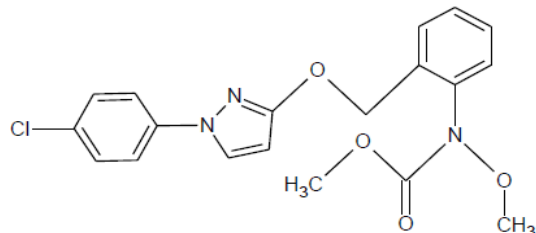
Tiametoxan: 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene (nitro)amine



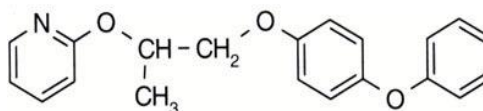
Tebuconazol: (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol



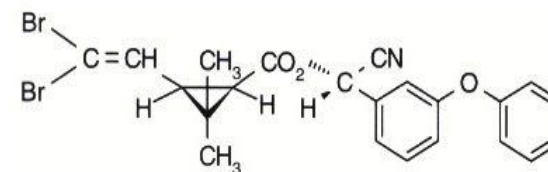
Epoxiconazol: (2RS,3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazole



Piraclostrobina: methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-ylloxymethyl]phenyl}(Nmethoxy) carbamate



Piriproxifeno: 4-phenoxyphenyl (RS) - 2 - (2-pyridyloxy)propyl ether



Deltametrina: (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

As propriedades físico-químicas dos agrotóxicos são informações fundamentais que podem ser examinadas para inferir os riscos de contaminação para o meio aquático [47]. As principais propriedades físico-químicas são: ponto de fusão (PF), solubilidade em água e em solventes orgânicos, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), constante de acidez (pK_a), ponto de degradação (PD), constante da lei de Henry (K_H) e pressão de vapor (mPa) [48]. A Tabela 3 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos compostos em análise.

Segundo Barceló, agrotóxicos que possuem $pK_a < 4$ são considerados ácidos e com $pK_a > 10$ básicos; os que apresentam $\log K_{ow} < 1,5$ são tidos como polares, $\log K_{ow} > 4$ são não polares, entre os dois valores são moderadamente polares e com $\log K_{ow} > 3$ sofrem bioacumulação [49].

Assim, os agrotóxicos em estudo podem ser classificados em: Tiametoxan: ácido ($pK_a = 0,41$) e polar ($\log K_{ow} = -0,13$); Tebuconazol: ácido ($pK_a = 2,3$) e moderadamente polar ($\log K_{ow} = 3,7$); Epoxiconazol: moderadamente polar ($\log K_{ow} = 3,6$); Piraclostrobina: ácido ($pK_a = 0,44$) e moderadamente polar ($\log K_{ow} = 3,99$); Piriproxifeno: não polar ($\log K_{ow} = 5,37$); Deltametrina: ácido ($pK_a = 4$) e não polar ($\log K_{ow} = 6,2$).

Tabela 3: Características físico-químicas dos pesticidas em estudo. **Fonte:** IUPAC, Pubchem, 2016 [48, 50].

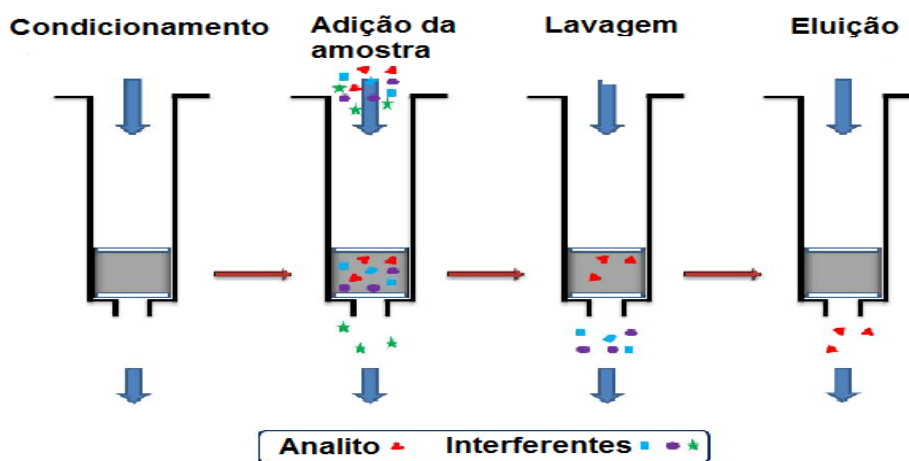
Agrotóxicos	MM (g mol ⁻¹)	PF (°C)	Pressão de vapor (mPa)	pKa	Log Kow	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Solubilidade em solvente orgânico (mg L ⁻¹)
Tiametoxan	291,71	139,1	$6,6 \times 10^{-6}$	0,41	-0,13	$4,1 \times 10^3$	Acetona: $4,8 \times 10^4$ Acetato de etila: 7×10^3 Diclorometano: $1,0 \times 10^4$ Metanol: $1,3 \times 10^4$
Tebuconazol	307,8	105	$1,3 \times 10^{-3}$	2,3	3,7	36	Diclorometano: 2×10^5 n-hexano: 80 Tolueno: $5,7 \times 10^5$
Epoxiconazol	329,76	136,7	$1,00 \times 10^{-2}$	NE	3,6	7,1	Acetona: $1,4 \times 10^5$ Etanol: $2,9 \times 10^4$ Acetato de etila: $1,0 \times 10^5$
Piraclostrobina	387,82	63,7-65,2	$2,6 \times 10^{-5}$	0,44	3,99	1,9	Acetona: 5×10^5 Metanol: $1,01 \times 10^4$ n-heptano: $3,7 \times 10^3$
Piriproxifeno	321,5	45-47	$1,33 \times 10^{-02}$	6,87	5,37	0.37	Acetona/Acetato de etila: 1×10^6 n-heptano/Metanol: $2,7 \times 10^4$
Deltametrina	505,2	101	$1,24 \times 10^{-6}$	4	6,2	2×10^{-4}	Metanol: $8,1 \times 10^3$ Acetona: $4,5 \times 10^5$ n-heptano: $2,5 \times 10^3$

MM: Massa Molar; PF: Ponto de Fusão; pKa: constante de acidez; Kow: coeficiente de partição octanol-água; NE: não encontrado.

1.3 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica, utilizando uma pequena coluna aberta, chamada de cartucho de extração, que contém uma fase sólida [51]. Pode abranger três ou quatro etapas sucessivas, como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do adsorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição dos analitos. **Fonte:** Lucci, 2012 [52].



Na primeira etapa, o cartucho deve ser condicionado de forma a promover a ativação do material adsorvente. A escolha do solvente para condicionamento dependerá do adsorvente a ser ativado e da matriz que será usada, optando-se por um solvente com características similares ao solvente no qual a amostra está dissolvida. É importante nessa fase não deixar o cartucho secar, ou seja, não deixar que todo solvente seja eliminado (deixar aproximadamente 2 mm acima do material do empacotamento com o solvente), pois isso pode causar vários problemas, como caminhos preferenciais, comprometendo a separação [10, 51].

Na segunda etapa, a percolação ou adição da amostra, a solução contendo o analito é adicionada no topo superior do cartucho e aspirada com pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa ou gás, de forma a penetrar no cartucho. Depende do volume da amostra, podendo variar de microlitros até

litros. Nessa etapa, o fluxo da amostra deve ser suficientemente baixo para permitir a retenção eficiente dos analitos e alto o suficiente, para evitar a excessiva duração do procedimento [51, 53].

A terceira etapa, a remoção dos interferentes, é uma etapa opcional, que corresponde à lavagem com solvente. O objetivo é eliminar os interferentes que ficaram retidos sem deslocar os analitos [51].

A última etapa é a eluição dos analitos, em que se dar por meio da passagem de um pequeno volume de solvente que tenha afinidade com os analitos, as substâncias de interesse são eluídas, sem remover os componentes retidos da matriz [53].

Dependendo da necessidade do trabalho, a SPE pode ser usada com diferentes objetivos. Dentre estes se destaca a concentração dos analitos ou enriquecimento, do qual a principal finalidade é a passagem, através do cartucho, de um grande volume de amostra com o propósito de reter somente o analito, deixando passar o solvente e os interferentes. Em seguida, os analitos são eluídos com um pequeno volume do solvente, de modo que estejam bem mais concentrados que na amostra original [9, 51].

Outras finalidades do SPE também podem ser salientadas, como por exemplo: Isolamento do analito ou *clean-up*, onde um determinado volume de amostra é percolado pelo cartucho com o intuito de separar os analitos dos interferentes da matriz; Isolamento da matriz, cujo objetivo é reter na fase sólida os interferentes da matriz, ao invés dos analitos que segue direto com o solvente da amostra. E ainda o procedimento de estocagem da amostra, que é muito utilizado quando se está distante do laboratório, evitando assim o transporte de grandes quantidades de amostra, além de possibilitar a análise de compostos pouco estável e/ou voláteis [9, 51, 53].

1.4 Adsorventes Alternativos

Em virtude do alto custo de alguns adsorventes comerciais, nos últimos anos há um crescente interesse para o uso de adsorventes alternativos. Estes

vêm sendo amplamente utilizados para remoção de poluentes em diferentes matrizes [54, 55].

Os materiais utilizados como adsorventes alternativos são uma opção sustentável e eficiente para a remediação de águas contaminadas com agrotóxicos, visto que esses materiais além de estarem disponíveis em grande proporção também apresentam propriedades físico-químicas que os apontam como adsorventes eficientes [56, 57].

Dentre os adsorventes empregados, o biocarvão vem despertando a atenção devido as suas aplicabilidades em diversas áreas como material eficiente e versátil para o meio ambiente. Além disso, tem sido bastante utilizado como um adsorvente devido à sua forte afinidade por adsorção de poluentes orgânicos [58 - 60].

O biocarvão é um material enriquecido com carbono produzido a partir da pirólise da biomassa sob condições limitadas de oxigênio. Diversos materiais orgânicos podem ser utilizados na produção do biocarvão, como resíduos urbanos, rejeitos industriais, adubos de animais e lodo de esgoto [57, 61]. A eficiência da produção do biocarvão a partir da biomassa depende de algumas variáveis essenciais que podem influenciar as propriedades do biocarvão, como: características da matéria-prima, condições do reator e temperatura de pirólise [62].

Dependendo de suas propriedades físico-químicas, o biocarvão pode ser aplicado como um agente para o solo, melhorando a capacidade de retenção de água, e aumentando o rendimento das culturas. Além disso, pode causar um efeito significativo na redução do aquecimento global através da redução das emissões de gases de efeito estufa e do sequestro de carbono atmosférico no solo [62 - 64].

1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é composto basicamente por reservatório de fase móvel, bombas de alta pressão, válvula de injeção, coluna, detector e sistema de aquisição de dados.

HPLC é uma importante técnica de análise, com capacidade de separar uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e seletividade. Também permite a separação de compostos que são termicamente instáveis e não voláteis, os quais não são identificados por cromatografia gasosa, em razão das temperaturas elevadas que esta técnica exige [11].

Para conseguir separar os analitos com sucesso é necessário selecionar as melhores condições de análise: a fase estacionária (coluna), fase móvel, fluxo da fase móvel, temperatura de separação, modo de eluição e sistema de detecção [65].

A coluna é importante no sistema cromatográfico, visto que é nela que ocorre a separação, o principal objetivo da cromatografia. Dado que o sucesso da separação dependerá em grande parte, da estrutura da fase estacionária, fato determinante de sua seletividade, não existe uma “coluna universal” que seja adequada para todas as condições de separação. O diâmetro dos poros, o tamanho da partícula, o comprimento e o diâmetro interno são variáveis que influenciam na eficiência cromatográfica [9, 11].

A fase móvel exerce um importante papel em HPLC, pois além de arrastar os componentes da amostra através do sistema cromatográfico, também participa do processo de separação dos analitos [11]. Uma fase móvel ideal precisará englobar pelo menos algumas condições: solubilizar completamente todos os componentes da amostra, apresentar baixa reatividade, possuir baixa viscosidade, baixa toxicidade e estar disponível em elevado grau de pureza. Por causa da dificuldade em encontrar solventes com todas estas características, é necessário buscar uma situação com melhores respostas analíticas [9].

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvida para a cromatografia líquida. Os mais modernos trabalham em amplo intervalo de concentração. O tipo de detector a ser escolhido dependerá das características do soluto, da sensibilidade e a seletividade requerida, e da versatilidade desejada. Alguns exemplos são os de radiação ultravioleta ou visível, índice de refração, eletroquímico, fluorescência, condutividade, espectrometria de massas [9, 65].

1.6 Validação do método analítico

A validação de um método analítico objetiva demonstrar que o método é confiável para a aplicação da proposta. O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) descreve validação como “a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos”. Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método possa fornecer resultados correspondentes às necessidades do problema analítico [25, 66, 67].

O processo de validação requer a determinação de alguns parâmetros analíticos que são fundamentais para avaliar a confiabilidade do método proposto. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de um método são: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade [68].

A linearidade representa a capacidade do método em produzir respostas diretamente proporcionais à concentração do analito em uma faixa de concentração específica. É recomendado que seja determinada pela análise de cinco ou mais níveis de concentração. Pode ser obtida a partir da expressão matemática entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie estudada, frequentemente expressa por uma equação de reta chamada de curva analítica, $y = a + bx$, a qual possibilita calcular o coeficiente de determinação (r^2), sendo este usado para uma estimativa da qualidade da curva. A ANVISA recomenda um coeficiente de

determinação igual a 0,99, enquanto o INMETRO aceita valores acima de 0,90 [25, 67, 69].

A sensibilidade está relacionada à capacidade do método identificar com fidelidade duas concentrações muito próximas. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da curva analítica, ou seja, quanto maior esse valor, maior a sensibilidade do método, sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade [9, 70].

A especificidade ou seletividade faz referência à ausência de picos cromatográficos interferentes. Isso representa à capacidade de um método avaliar de maneira inequívoca o analito na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz [66, 71].

A precisão normalmente é determinada para circunstâncias específicas de medição, podendo ser avaliada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo geralmente obtido pelo coeficiente de variação (CV) expresso em %. A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência aceito como valor verdadeiro. O ensaio de recuperação é um dos processos utilizados para avaliar a exatidão do método quando não estão disponíveis materiais de referência certificados [72, 73].

O limite de detecção (LD) pode ser definido como sendo a menor concentração de um analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração da substância analisada que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O LD e o LQ podem ser determinados de diferentes formas: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo que para a seleção entre uma delas deve levar em conta a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária [74].

1.7 Revisão da Literatura

É possível encontrar na literatura alguns trabalhos relatando a determinação de agrotóxicos em água de irrigação da cultura de arroz empregando a técnica de extração em fase sólida (SPE) utilizando adsorventes clássicos. No entanto, nenhum desses trabalhos faz uso do biocarvão como adsorvente.

A Tabela 4 apresenta alguns estudos que fizeram uso de SPE para determinação de agrotóxicos em água ambientais fazendo uso de adsorventes comerciais e alternativos.

Shi *et al.*, 2014 [75], sintetizaram o grafeno, e após sua caracterização, utilizaram como adsorvente na extração em fase sólida (SPE) dos seis agrotóxicos carbamatos (pirimicarb, baygon, carbaryl, isoprocarb, baycarb e diethofencarb) em amostras de água ambientais. Antes da extração, o cartucho de SPE foi preenchido com 30 mg do grafeno. Na etapa do condicionamento, utilizou-se 3 mL de metanol, 3 mL de acetona, 3 mL de acetonitrila e 9 mL de água duplamente destilada. Em seguida, 50 mL da solução de amostra foi passada através do cartucho com um fluxo de 1 mL min⁻¹. E por fim, eluido com 5 mL de acetona e analisada UPLC-MS/MS. As recuperações para os agrotóxicos carbamatos nas amostras de água ficaram na faixa de 81,1% a 111,0%. O método proposto apresentou precisão, linearidade, repetibilidade e recuperação satisfatórias.

Papadakis *et al.*, 2015 [76], monitoraram 147 agrotóxicos e metabólitos em 6 rios e 10 lagos do norte da Grécia. Na SPE, os cartuchos C-18 (200 mg) foram pré-condicionados com metanol e água destilada. Para a eluição dos analitos foram utilizados 5 mL de uma mistura de acetato de etila e metanol (90:10, v/v) seguido por 4 mL de n-hexano. Em seguida, o extrato foi seco e redissolvido em acetato de etila para posterior análise em GC/MS. As concentrações de seis agrotóxicos estavam acima do limite máximo permitido de 0,1 µg L⁻¹ para água potável.

Ma *et al.*, 2015 [77], desenvolveram um método de extração em fase sólida (SPE) utilizando nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) como

adsorvente com determinação por HPLC para quatro pesticidas de pirazol e pirrole (fenpiroximato, clorfenapir, fipronil e flusilazol) em amostras de água ambientais. Antes de carregar as amostras, o cartucho foi empacotado com 150 mg de MWCNTs, e condicionado com 3 mL de acetato de etila, 3 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura. Em seguida, 1 L da amostra de água foi carregada com fluxo de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. E por fim, foram eluídos com 10 mL de acetato de etila e analisados por HPLC-DAD. As recuperações do método variaram entre 92,2-105,9 e 98,5-103,9% para amostras de água do reservatório e água do mar, respectivamente.

Hao *et al.*, 2015 [78], avaliaram um adsorvente alternativo sintetizado em laboratório, ZIF-8-NPC (carbono nanoporoso), com o propósito de extrair três agrotóxicos carbamatos, metolcarbe, isoprocarbe e dietofencarbe a partir de amostras de água. Para a extração dos analitos foram colocados 15 mg do adsorvente ZIF-8-NPC em um cartucho de SPE. O cartucho foi pré-condicionado com metanol e água, depois, 100 mL de solução da amostra foi passado através do cartucho, a um fluxo de 3 mL min^{-1} , e por fim, eluído com 3 mL de acetonitrila. Em seguida, a solução foi filtrada e analisada por HPLC/UV. Com o adsorvente alternativo as recuperações obtidas foram entre 94,4 e 99,6 %.

Olivio *et al.*, 2015 [79], validaram um método por HPLC/ FLU (Fluorescência) para determinação do agrotóxico glifosato em amostras de águas subterrâneas utilizando SPE. O cartucho C-18 foi condicionado com 3 mL de água e 2 mL de cloroformato de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (FMO-CL). Em seguida, na etapa da lavagem foi usado 1 mL de água de poço, e subsequentemente foi eluído com 3 mL de diclorometano. Os valores de recuperação variaram entre 90 e 101%. E o glifosato foi detectado em 5 dos 13 poços avaliados.

Mekonem *et al.*, 2016 [80], examinaram os riscos dos resíduos dos agrotóxicos 2,4-D, malationa, diazinona, fenpropimorfe e pirimifós-metilico em diferentes fontes de água potável. As extrações das amostras foram feitas por extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólido (SPE), e analisadas por LC-MS/MS. No procedimento de SPE, o cartucho C-18 foi ativado com 1

mL de metanol. Em seguida, 1L da amostra de água foi passada através do cartucho, eluído com 10 mL de *n*-hexano e analisado por LC-MS/MS. O procedimento se mostrou eficiente com valores de recuperação entre 72 e 92 %.

Rodrigues-Gonzales *et al.*, 2016 [81], desenvolveram um método para quantificação e confirmação de 17 agrotóxicos em água do mar. A SPE foi realizada por um auto-amostrador acoplado ao instrumento UPLC-MS/MS. A SPE on-line foi realizada utilizando um cartucho OASIS HLB para a pré-concentração e uma coluna para a separação analítica. As recuperações de SPE on-line em amostra de água salgada foram avaliadas, encontrando valores aceitáveis de 80,3-99,8%. O método mostrou precisão adequada, e bons valores de recuperação foram obtidos para os compostos.

Vieira *et al.*, 2016 [82], avaliaram os riscos aos recursos hídricos gerados pelos agrotóxicos utilizados no cultivo de arroz irrigado e a toxicidade do herbicida bentazona e inseticida carbofurano. Os resíduos dos pesticidas foram isolados por SPE (C-18) e determinados por HPLC UV. Para determinar o bentazona, a amostra foi acidificada a pH 2 (pela adição de HCl) e eluída com 5 mL de acetonitrila seguido por 4 mL de acetato de etila. Para o carbofurano, a acidificação não foi necessária e, na eluição foi utilizado 9 mL de acetonitrila. Para ambos os agrotóxicos os valores de recuperação foram superiores a 90%.

Ouyang *et al.*, 2017 [83], determinaram as concentrações de três pesticidas (atrazina, oxadiazônio e isoprotiolano) em água de rio. Os cartuchos Oasis HLB foram utilizados na extração em fase sólida (SPE), onde foram condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de acetona/*n*-hexano, 5 mL de acetato de etila, 3 mL de metanol e 10 mL de água ultra-pura. Em seguida, os cartuchos foram lavados com 10 mL de água ultra-pura. E posteriormente, a eluição ocorreu com 3 mL de acetonitrila, 10 mL de acetona/*n*-hexano e 10 mL de acetato de etila. As concentrações de pesticidas foram determinadas por GC/MS. Os resultados mostraram que os três pesticidas foram detectados em toda a bacia hidrográfica, sendo que o isoprotiolano foi detectado no valor máximo de 1,082 $\mu\text{g L}^{-1}$ no escoamento superficial do arrozal, e a atrazina foi associada ao maior valor de quase 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 4: Determinação de agrotóxicos em águas ambientais empregando SPE utilizando adsorventes comerciais e alternativos.

Referência	Matriz (Volume de amostra, mL)	Analitos	Adsorvente (Massa, mg)	Volume e solvente de eluição	Técnica Instrumental
Shi <i>et al.</i> , 2014	Águas de rios, poços e lagos (50)	6 agrotóxicos	Grafeno (30)	5 mL de Acetona	UHPLC MS/MS
Papadakis <i>et al.</i> , 2015	Água de rios e lagos (1000)	147 agrotóxicos	C-18 (200)	5 mL de Acetato de etila e 5 mL de Metanol; 4 mL de hexano	GC-MS
Ma <i>et al.</i> , 2015	Água da torneira e do mar (1000)	fenpiroximato, clorfenapir, fipronil e flusilazol	MWCNTs (150)	10 mL de Acetato de etila	HPLC-DAD
Hao <i>et al.</i> , 2015	Água da torneira (100)	Metolcarbe, isoprocarbe e dietofencarbe	ZIF-8-NPC (15)	3 mL de Acetonitrila	HPLC-UV
Olivio <i>et al.</i> , 2015	Água de poço	Glifosato	C-18 (100)	3 mL de Diclorometano	HPLC-FLU

Continuação

Mekonem <i>et al.</i> , 2016	Água potável (1000)	2,4-D, malationa, diazinona, fenpropimorfe e pirimifós-metílico	C-18	10 mL de n-hexano	LC-MS/MS
Rodrigues-Gonzales <i>et al.</i> , 2016	Água do mar (50)	17 agrotóxicos	Oasis HLB (200)	5 mL de Metanol	UPLC-MS/MS
Vieira <i>et al.</i> , 2016	Água de rio (300)	Bentazona e carbofurano	C-18 (500)	5 mL de Aetonitrila e 4 mL Acetato de etila	HPLC-UV
Ouyang <i>et al.</i> , 2017	Água de rio	Atrazina, oxadiazônio e isoprotiolano	Oasis HLB	3 mL de Acetonitrila, 10 mL de acetona/n-hexano e 10 mL de Acetato de etila	GC-MS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos para aplicação em água de cultivo de arroz irrigado utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis/DAD.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar os agrotóxicos de acordo com a utilização no cultivo de arroz irrigado na região do Baixo São Francisco;
- Otimizar as condições cromatográficas de determinação dos agrotóxicos selecionados por HPLC UV-Vis/DAD;
- Otimizar uma metodologia de extração por SPE, utilizando o biocarvão como adsorvente e fases comerciais;
- Validar o método desenvolvido por SPE e HPLC UV-Vis/DAD;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Acetonitrila grau HPLC adquirida da Tedia (Fairfield, EUA); metanol grau HPLC (J.T Baker, EUA); acetona (Macron Fine Chemicals, Phillipsburg, USA); Ácido Acético Glacial (Cromoline, Diadema, Brasil); Água ultrapurificada obtida de sistema Milli-Q modelo gradiente (Millipore Corporation); Cartuchos SPE Strata-X (Phenomenex), 200 mg/3 mL; Cartucho SPE LC-18 (SupelcleanTM), 500 mg/6 mL.

3.2 Equipamentos

Evaporador rotatório (Fisatom 802D); Balança analítica (Mettler Toledo AL 204); Sistema para SPE vacuum manifold (Varian, Walnut Creek, CA, EUA).

3.3 Padrões certificados dos agrotóxicos

Foram utilizados padrões certificados dos agrotóxicos: Deltametrina (Fluka, Suíça, pureza 99,7%) Epoxiconazol (Fluka, Suíça, pureza 99,0%), Piraclostrobina (Riedel de Hään, Alemanha, pureza 99,9%), Piriproxifeno (Fluka, Suíça, pureza 99,3%), Tebuconazol (Accustandard, EUA, pureza 98,7%), Tiametoxan (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, pureza 99,6%).

3.4 Preparo das soluções padrão dos agrotóxicos

As soluções estoque foram preparadas, individualmente, pesando-se massas de aproximadamente 0,0100 g dos padrões de agrotóxicos e solubilizadas em 10 mL de acetonitrila grau HPLC, obtendo concentrações de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos agrotóxicos. A partir dessas foram preparadas soluções individuais de trabalho e soluções conjuntas dos padrões nas concentrações utilizadas para construção das curvas analíticas e realização dos ensaios de recuperação.

As soluções de trabalho foram utilizadas por no máximo 30 dias.

3.5 Condições cromatográficas de análise dos agrotóxicos

3.5.1 HPLC- UV-Vis/DAD (Sistema Analítico)

O estudo prévio das soluções dos agrotóxicos foi realizado em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU – 20A3, sistema binário de bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas CTO-

20A; coluna analítica Synergi RP-80 Å C-18 4 µm (250 x 4,6 mm, Phenomenex) com coluna de guarda constituída da mesma fase estacionária da coluna. O software de gerenciamento foi o LC Solution.

3.5.2 HPLC UV-Vis (Sistema Semi-preparativo)

As análises instrumentais e o desenvolvimento do método de extração foram realizados em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo Prominence composto por: módulo de comunicação CBM-20A, degaseificador DGU-20A3R, sistema binário de bombas LC-6AD, injetor automático SIL-20A, detector espectrofotométrico UV-Vis SPD-20A. O forno de colunas utilizado foi da marca Younglin Instrumentos. Coluna analítica Synergi RP-80 Å C-18 4 µm (250 x 4,6 mm, Phenomenex) com coluna de guarda constituída da mesma fase estacionária da coluna e o software de gerenciamento foi o LC Solution.

As condições de análise para os sistemas analítico e semi-preparativo estão descritas na Tabela 5. E a Tabela 6 apresenta o respectivo gradiente de eluição utilizado em cada sistema.

Tabela 5 - Condições de análise otimizadas nos sistemas cromatográficos.

Parâmetros	Sistema Analítico	Sistema Semi-preparativo
Fase Móvel	Acetonitrila:Água	
Fase estacionária	Coluna Synergi 4u polar-RP 80 Å	
Vazão da Fase Móvel	1 mL min ⁻¹	
Volume de Injeção	20 µL	
Comprimentos de Onda	220, 252 e 275 nm	220 e 263 nm

Tabela 6 - Gradiente de eluição para os sistemas cromatográficos Analítico e Semi-preparativo.

Gradientes de Eluição					
Sistema Analítico			Sistema Semi-preparativo		
Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %	Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %
0,01	90	10	0,01	75	25
20	30	70	10	40	60
25	30	70	15	30	70
35	0	100	20	20	80
36	90	10	25	0	100
40	90	10	26	75	25
			30	75	25

3.6 Procedimentos de extração dos agrotóxicos por SPE

No sistema para SPE, com o fluxo de aproximadamente 5 mL min⁻¹, o cartucho contendo 150 mg de biocarvão de aguapé foi condicionado com a adição de 3 mL de acetona, 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapurificada. Em seguida, foi feita a percolação de 500 mL de amostra de água em diferentes níveis de fortificação. Na etapa da lavagem foi usado 3 mL de uma mistura de metanol:água (5:95 v/v). E por fim, na etapa da eluição, 10 mL de metanol:acetonitrila (1:1 v/v) foi utilizado como solvente de eluição. Os eluatos foram coletados em um balão de fundo redondo e concentrados em evaporador-rotatório (40°C e 60 rpm) até cerca de 1 mL. O volume do extrato foi ajustado em um balão volumétrico de 1 mL. O extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por HPLC UV-Vis/DAD (Sistema Analítico).

3.7 Obtenção do biocarvão de aguapé

O biocarvão de aguapé foi obtido e caracterizado conforme descrito na referência [84].

Amostras de aguapé foram coletadas no Açude Macela, situado no Município de Itabaiana-SE, e deixadas secar durante uma semana a temperatura ambiente. Em seguida, foi moído e submetido a um processo de

pirólise. Após a obtenção, o biocarvão foi lavado em filtragem com água destilada e por fim foi seco em estufa por 24 horas.

Posteriormente, este material foi caracterizado através das análises elementar CHN, IV (espectroscopia na região do infravermelho), MEV (microscopia eletrônica de varredura) e área superficial pelo método BET.

3.8 Limpeza da vidraria

A lavagem da vidraria seguiu procedimento padrão utilizado no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP) como segue:

- Enxágue com água corrente, por duas vezes;
- Lavagem com solução detergente neutro 5%;
- Enxágue da solução detergente com água corrente até a completa retirada;
- Lavagem com água destilada;
- Enxágue com acetona;
- Secagem em estufa a 100°C (exceto as vidrarias volumétricas).

3.9 Descartes dos reagentes

As soluções descarte de agrotóxicos foram estocadas em frascos de vidro e armazenadas no laboratório. Os solventes utilizados nas análises e lavagem das vidrarias foram armazenados em recipientes de descarte de solvente devidamente identificados para posterior coleta realizada por empresa responsável.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi desenvolvido utilizando dois sistemas de cromatografia líquida, o sistema HPLC UV-Vis/DAD (Sistema Analítico) e sistema HPLC UV-Vis (Sistema Semi-preparativo).

O HPLC Analítico objetiva a determinação qualitativa e quantitativa de um composto, em quantidades menores de amostra (μg). Enquanto que HPLC Semi-preparativo o objetivo é o isolamento ou purificação de um composto, em quantidades de amostra maiores (mg) [100].

4.1 SISTEMA ANALÍTICO (HPLC UV-Vis/DAD)

4.1.1 Otimização das condições cromatográficas de análise

Para o desenvolvimento do trabalho foram selecionados 5 agrotóxicos com base na utilização no cultivo de arroz irrigado: Deltametrina, Epoxiconazol, Piraclostrobina, Tebuconazol e Tiametoxan, para os quais as condições cromatográficas de análise foram inicialmente otimizadas no sistema HPLC UV-Vis/DAD (Sistema Analítico).

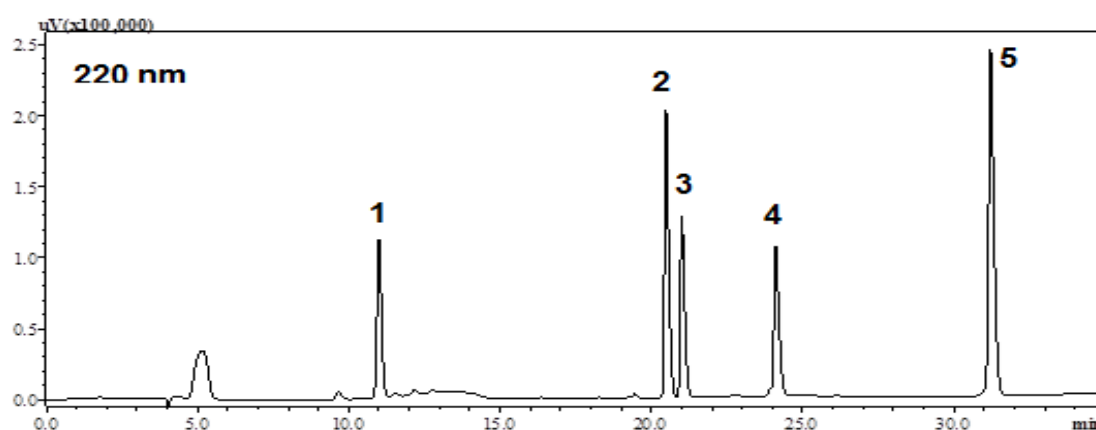
Inicialmente, as soluções de trabalho de 5 agrotóxicos em concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram analisadas individualmente no HPLC com detector UV-Vis/DAD em modo exploratório de eluição.

O método de análise exploratório consiste na variação da composição do solvente orgânico da fase móvel de 5 - 100%, em um tempo total de corrida de 60 minutos, com o objetivo de identificar os tempos de retenção de cada agrotóxico e consequentemente conhecer a proporção de solvente orgânico que é necessário para que cada um deles seja eluído pela coluna [85].

Tendo em vista que na análise exploratória o primeiro analito, tiametoxan, para ser eluído necessitou de aproximadamente de 32% de acetonitrila, solvente orgânico usado na composição da fase móvel (acetonitrila:água), e o último de cerca de 82%, foi otimizado uma programação de eluição no modo gradiente em HPLC UV-Vis/DAD para análise dos agrotóxicos selecionados

(Tabela 6, Sistema Analítico). A Figura 4 apresenta o perfil cromatográfico obtido na análise por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos a partir do gradiente de eluição desenvolvido, apresentado anteriormente na Tabela 6.

Figura 4 - Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão dos agrotóxicos em concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. 1- Tiametoxan (10,99 min), 2- Tebuconazol (20,48 min), 3- Epoxiconazol (21,01 min), 4- Piraclostrobina (24,11 min), 5- Deltametrina (31,20 min). Para condições de análise, ver tópico 3.5.



Através das análises cromatográficas pode-se verificar que os analitos responderam de forma satisfatória nas condições cromatográficas utilizadas, pois viabilizou análise simultânea dos agrotóxicos com boa resolução dos picos cromatográficos. Os analitos tebuconazol e epoxiconazol apresentaram tempos de retenção próximos, pois como pertencem a grupos químicos semelhantes apresentam propriedades físicas também semelhantes. Dessa forma, foram realizados alguns ajustes no gradiente de eluição até apresentarem uma nítida separação (Figura 4).

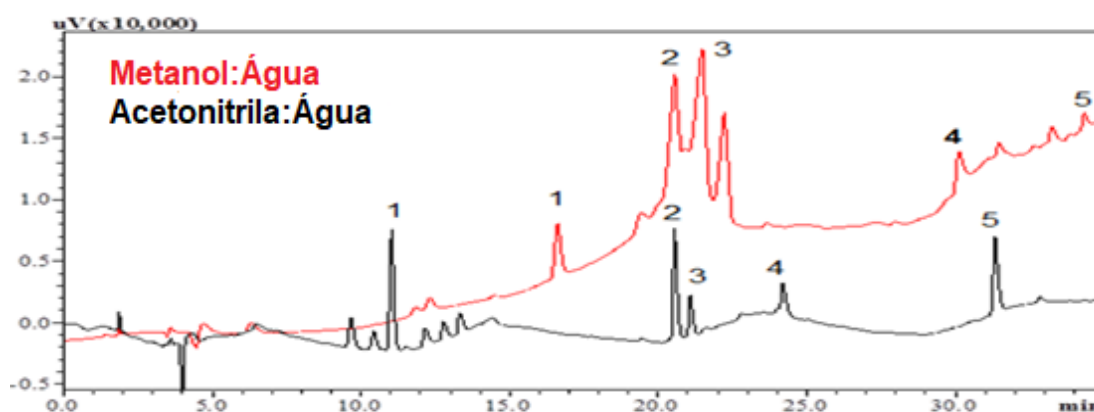
4.1.2 Seleção da fase móvel

Outro parâmetro examinado para otimização das condições cromatográficas de análise foi a influência da composição da fase móvel no processo de separação dos compostos. Em geral, as fases móveis mais

utilizadas para determinação de agrotóxicos por HPLC em fase reversa constituída de metanol:água ou acetonitrila:água [86].

Assim, neste trabalho foi testado tanto acetonitrila:água como metanol:água. Os resultados com fase móvel cnstituída de acetonitrila:água foram satisfatórios, pois apresentaram uma melhor resolução e um menor tempo de análise dos compostos, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Cromatogramas das análises obtidos por HPLC UV-Vis/DAD dos agrotóxicos em estudo na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando metanol:água (vermelho) e acetonitrila:água (preto) como composição da fase móvel no comprimento de onda de 220 nm. 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Deltametrina. Para condições de análise, ver tópico 3.5.



4.1.3 Testes da composição da fase estacionária

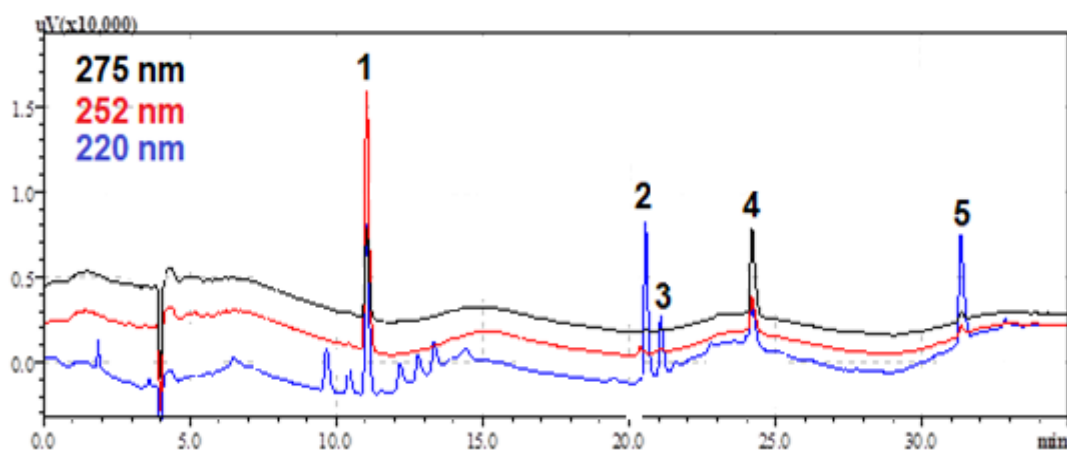
Uma etapa importante no desenvolvimento dos métodos cromatográficos é a comparação e a escolha da coluna. As colunas analíticas mais usadas em HPLC são as de fases reversas à base de sílica funcionalizada com grupos alquila principalmente octil (C-8) e octadecil (C-18) [87]. Com o intuito de conhecer o perfil cromatográfico dos analitos, foram avaliadas duas colunas cromatográficas com C-18 e uma C-8 em sua composição, cujas especificações são descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Características das colunas utilizadas.

Coluna (Fabricante)	Diâmetro dos poros (Å)	Tamanho da partícula (µm)	Comprimento X Diâmetro interno (mm)
Synergi C-18 RP-80 Å (Phenomenex)	80	4	250 x 4,6
Kinetex C-18 (Phenomenex)	100	2,6	150 x 4,6
Microsorb-MV C-8 (Varian)	100	5	250 x 4,6

A primeira coluna testada foi a Synergi RP-80 Å. Esta coluna de fase C-18 apresenta em sua estrutura um grupo fenil ligado ao grupo éter em uma cadeia alquila quimicamente ligada à superfície da sílica [88]. A análise pode ser observada na Figura 6.

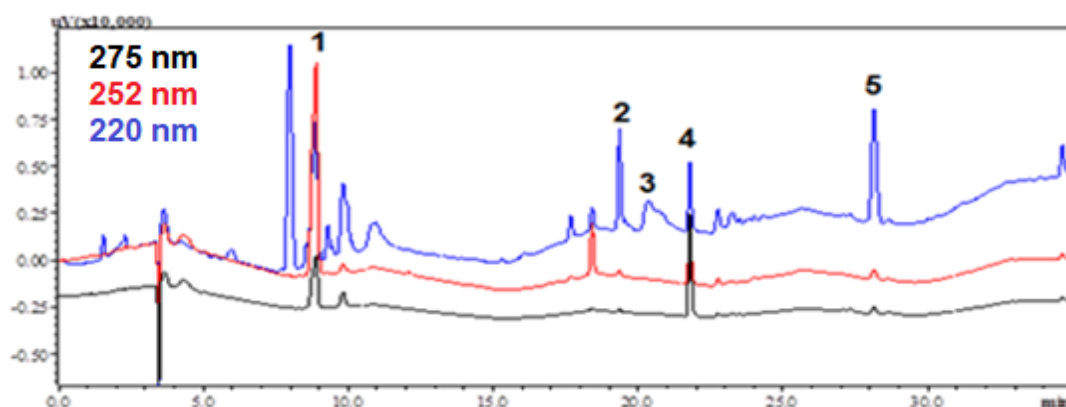
Figura 6 - Perfil Cromatográfico obtido por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução mista dos agrotóxicos analisados com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando a coluna a Synergi RP-80 Å. 1- Tiametoxan (11,03 min), 2- Tebuconazol (20,55 min), 3- Epoxiconazol (21,07 min), 4- Piraclostrobina (24,19 min), 5- Deltametrina (31,32 min). Para condições de análise, ver tópico 3.5.



Na Figura 6 pode-se observar que houve uma separação satisfatória dos analitos, apresentando picos bem definidos e simétricos.

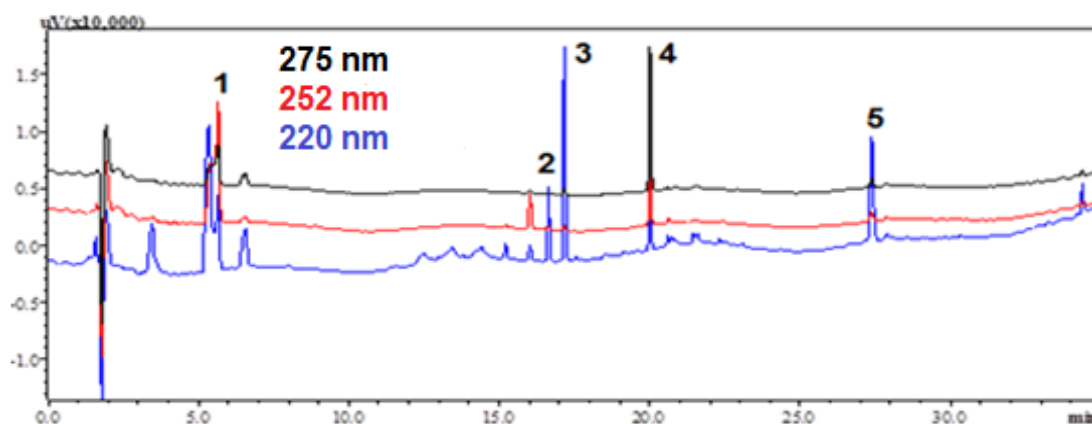
Em seguida, esses 5 agrotóxicos, deltametrina, epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol e tiametoxan, foram analisados na coluna Microsorb-MV-100 Å (com C-8 em sua composição). O uso da Microsorb acarretou em uma diminuição nos tempos de retenção dos analitos, devido às cadeias hidrofóbicas serem mais curtas. O cromatograma pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatogramas das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos estudados com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando a coluna Microsorb-MV-100 Å. 1- Tiametoxan (8,89 min), 2- Tebuconazol (19,35 min), 3- Epoxiconazol (20,47 min), 4- Piraclostrobina (21,78 min) 5- Deltametrina (28,14 min). Para condições de análise, ver tópico 3.5.



Por fim, foi avaliada a coluna Kinetex-100 Å, que apresenta C-18 em sua composição. Trata-se de uma coluna com tamanho de partícula menor que a Synergi RP-80 Å e a Microsorb-MV-100 Å. À medida que diminui o tamanho da partícula, a profundidade dos poros também diminui, e a saída das moléculas da amostra dos poros ocorre rapidamente, permitindo a obtenção de análises mais rápidas sem perda de eficiência [89]. O resultado da análise com a coluna Kinetex-100 Å pode ser observado na Figura 8.

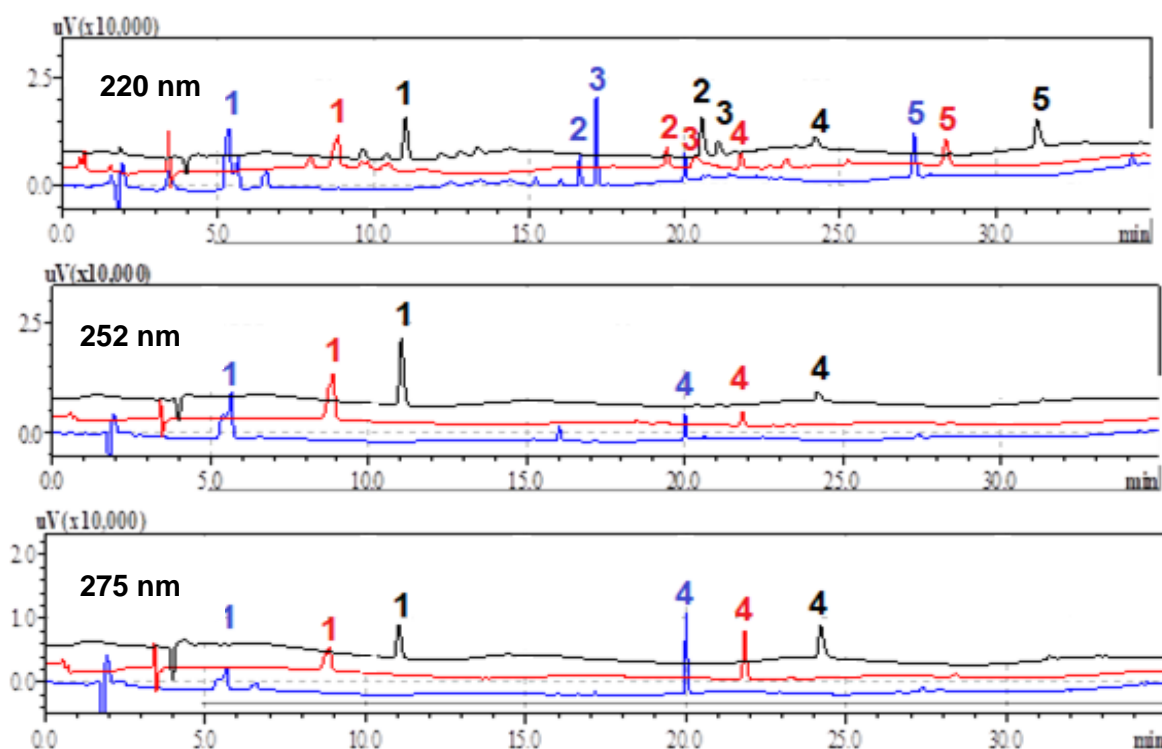
Figura 8 - Cromatograma das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ com a coluna Kinetex-100 Å. 1- Tiametoxan (5,34 min), 2- Tebuconazol (16,63 min), 3- Epoxiconazol (17,16 min), 4- Piraclostrobina (19,99 min), 5- Deltametrina (27,38 min). Para condições de análise, ver tópico 3.5.



Analisando a Figura 8, pode-se observar que os analitos também apresentaram picos simétricos e com boa definição. No entanto, quando se fez uso da coluna Kinetex-100 Å, a pressão do sistema cromatográfico chegou próximo ao seu limite de trabalho (200 Kg/cm^2), o que pode ocasionar danos ao sistema de injeção do equipamento. Isso acontece porque quanto menor o tamanho de partícula, menor é o caminho de difusão da substância na fase móvel, maior a resistência ao fluxo pela fase estacionária, ocorrendo aumento da pressão [90].

Assim, fazendo a comparação das colunas testadas, no qual os resultados podem ser observados na Figura 9, a coluna Synergi RP-80 Å foi selecionada para dar sequência às otimizações das condições cromatográficas, pois apresentou bons resultados para todos os agrotóxicos analisados e já se encontrava em uso pelo grupo de pesquisa.

Figura 9 – Comparação dos cromatogramas das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ com as colunas testadas, Synergi RP-80 Å (Preto), Microsorb-MV-100 Å (Vermelho) e Kinetex-100 Å (Azul). 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Deltametrina.



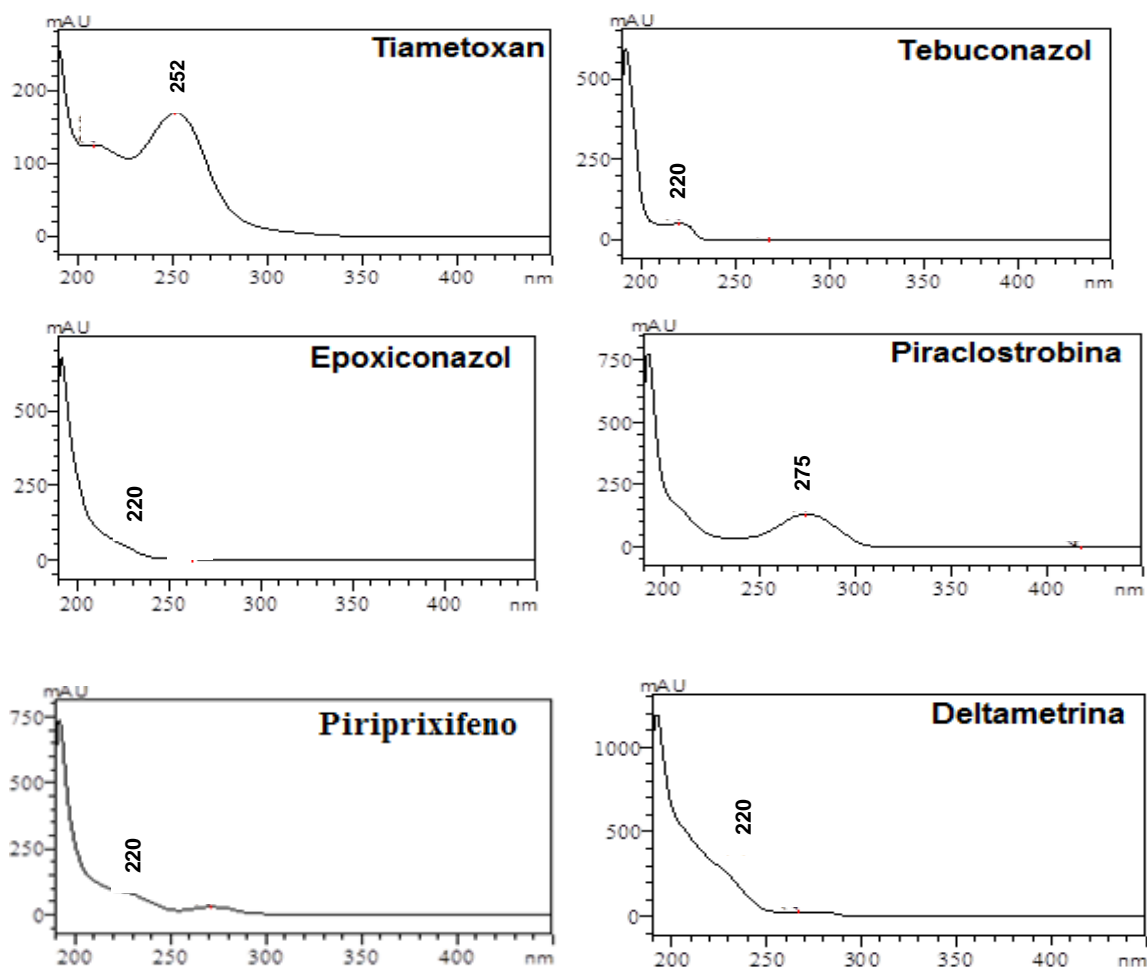
4.1.4 Seleção dos comprimentos de onda de máxima absorção

A técnica de detecção utilizada na análise cromatográfica do Sistema Analítico (HPLC UV-Vis/DAD) emprega um arranjo de fotodiodos. Essa configuração permite que cada diodo monitore uma faixa estreita de comprimento de onda, possibilitando uma varredura completa da região de interesse no final da análise, obtendo o espectro de absorção para cada analito [9].

A obtenção de um espectro para cada composto permite a seleção do comprimento de onda de máxima absorção de cada um deles, melhorando a detectabilidade e eliminando picos interferentes [11]. A Figura 10 apresenta os espectros de absorção indicando o comprimento de onda de máxima absorção

dos 6 agrotóxicos em estudo. Pois, por ser apontado como possível causador da microcefalia, foi incluído também nesse trabalho o agrotóxico piriproxifeno, pois o mesmo é colocado diretamente nos reservatórios de água potável ou pulverizado nas cidades afetadas pelo surto de microcefalia [43].

Figura 10 - Espectros de absorção indicando o comprimento de onda de máxima absorção dos agrotóxicos em estudo obtidos por HPLC UV Vis/DAD.

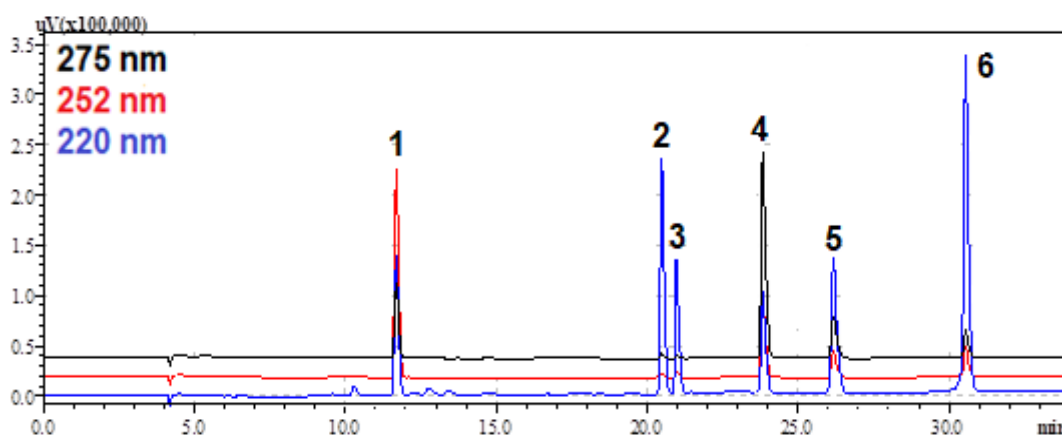


Com base nos espectros de absorção (Figura 10), foram selecionados os comprimentos de onda que promoveram melhor absorção da luz para cada analito em estudo, os quais foram monitorados nas análises. Os comprimentos de onda selecionados para os agrotóxicos analisados estão descritos na Tabela 8, bem como seus respectivos tempos de retenção. E a Figura 11 mostra os cromatogramas obtidos com a inclusão do agrotóxico piriproxifeno nas análises.

Tabela 8 - Agrotóxicos determinados com seus respectivos tempos de retenção (Tr) e comprimentos de onda (λ).

Agrotóxicos	Tr (min)	λ (nm)
1 -Tiametoxan	11,68	252
2 -Tebuconazol	20,65	220
3 - Epoxiconazol	21,07	220
4 - Piraclostrobina	23,89	275
5 - Piriproxifeno	26,25	220
6 - Deltametrina	30,32	220

Figura 11: Cromatogramas das análises obtidas por HPLC UV-Vis/DAD de uma solução padrão conjunta dos agrotóxicos em estudo com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos comprimentos de onda selecionados utilizando como composição da fase móvel acetonitrila:água e a coluna Synergi RP-80 Å. 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina.



Contudo, um defeito no controlador de pressão do sistema de bombeamento do cromatógrafo inviabilizou o uso do modo gradiente de eluição neste equipamento. Desta forma, as condições cromatográficas de análise foram ajustadas para permitir a análise dos agrotóxicos em um outro sistema de cromatografia líquida, HPLC UV-Vis (Sistema Semi-preparativo), sem que houvesse prejuízo para o desenvolvimento do trabalho.

4.2 SISTEMA SEMI-PREPARATIVO (HPLC UV-Vis)

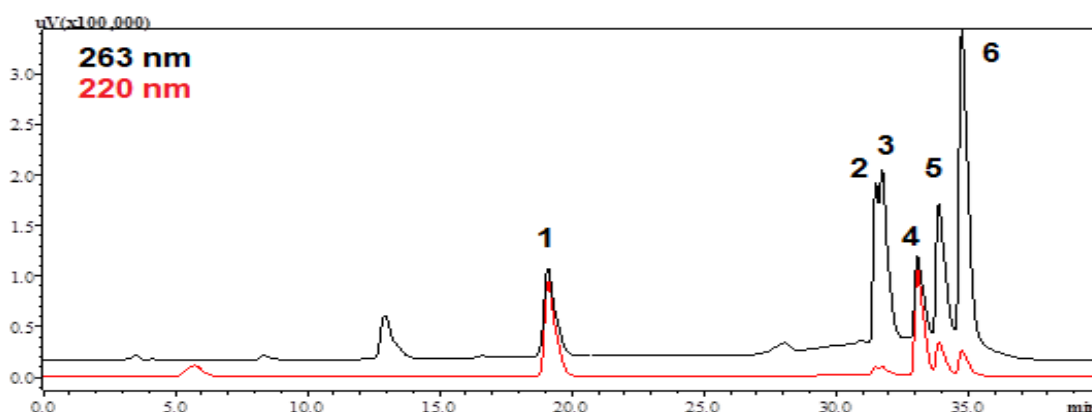
Para as análises instrumentais do Sistema Semi-preparativo, foram utilizadas as condições do Sistema Analítico, sendo alterado somente os comprimentos de onda e o gradiente de eluição, como pode ser visto anteriormente nas Tabelas 5 e 6 (item 3.5.2).

A seleção dos comprimentos de onda de máxima absorção no HPLC UV-Vis foi baseada naqueles do Sistema Analítico. No entanto, como o Sistema Semi-preparativo permite trabalhar com apenas dois comprimentos de onda, foi mantido o de 220 nm, pois dos seis agrotóxicos estudados, quatro respondiam bem nesse comprimento de onda. E a escolha do segundo comprimento de onda foi realizada de forma que os demais compostos apresentassem resolução e detectabilidade adequadas.

Como os agrotóxicos tiametoxan e piraclostrobina apresentaram melhor absorção nos comprimentos de onda 252 e 275 nm, respectivamente, no Sistema Analítico, estes agrotóxicos foram analisados em diferentes comprimentos de onda, 252, 260, 263, 265, 270 e 275 nm. Em seguida, foi avaliado em termos de porcentagem quanto esses agrotóxicos perderiam em área nestes comprimentos de onda analisados. O comprimento de onda que apresentou menor perda de área em porcentagem foi o de 263 nm, por isso este foi escolhido para ser trabalhado no Sistema Semi-preparativo com os agrotóxicos tiametoxan e piraclostrobina.

Selecionados os dois comprimentos de onda, 220 e 263 nm, foi analisada uma solução padrão conjunta dos 6 agrotóxicos em HPLC UV-Vis, utilizando o mesmo gradiente de eluição usado no Sistema Analítico (Figura 12).

Figura 12 - Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos estudados com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos comprimentos de onda selecionados, 220 e 263 nm. 1- Tiametoxan (19,10 min), 2- Tebuconazol (31,50 min), 3- Epoxiconazol (31,74 min), 4- Piraclostrobina (32,05 min), 5- Piriproxifeno (33,85 min), 6- Deltametrina (34,75 min). Para condições de análise, ver tópico 3.5.2.



Como os padrões tebuconazol (2) e epoxiconazol (3) apresentam tempos de retenção próximos, nas condições iniciais avaliadas os mesmos não obtiveram resolução adequada. Visando à separação desses compostos, foram testados gradientes de eluição utilizando as condições de análise descritas na Tabela 5 (página 27). Os gradientes de eluição estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Gradientes de eluição desenvolvidos para o sistema semi-preparativo.

Gradiente 1			Gradiente 2		
Tempo (min)	Água %	ACN %	Tempo (min)	Água %	ACN %
0,01	80	20	0,01	75	25
10	40	60	10	30	70
20	30	70	15	25	75
30	10	90	20	20	80
35	0	100	25	0	100
36	80	20	26	75	25
40	80	20	30	75	25

As Figuras 13 e 14 apresentam os perfis cromatográficos adquiridos das análises de uma solução padrão na concentração $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos agrotóxicos a partir dos gradientes de eluição 1 e 2 (Tabela 9).

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 1. 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina. Para condições de análise, ver tópico 3.5.2.

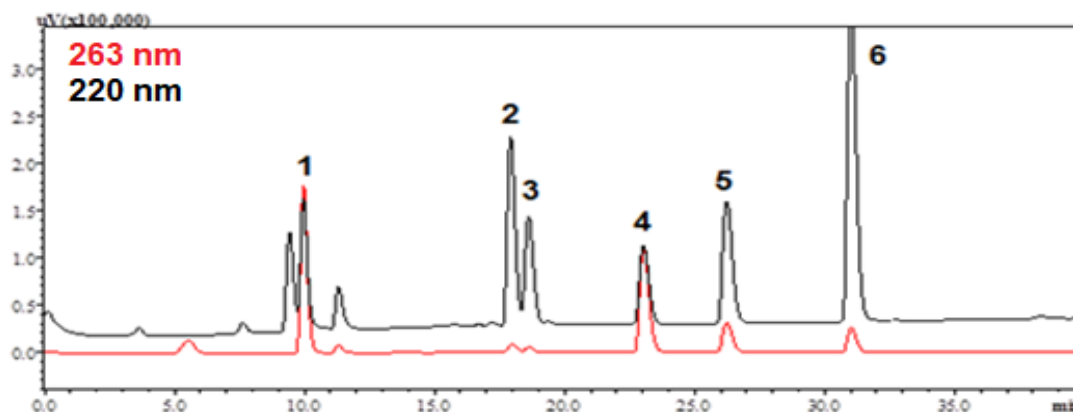
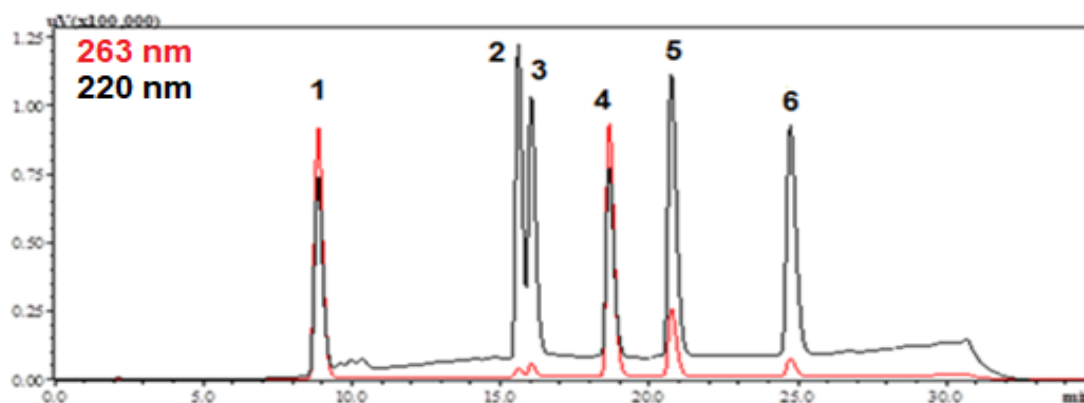


Figura 14 - Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 2. 1- Tiametoxan, 2 - Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina. Para condições de análise, ver tópico 3.5.2.



Observando as Figuras 13 e 14 nota-se que os gradientes de eluição 1 e 2 não foram eficientes na separação dos analitos tebuconazol e epoxiconazol. Dessa maneira, com o intuito de separar esses analitos foram testados outros gradientes de eluição, descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Gradientes de eluição testados no sistema semi-preparativo.

Gradiente 3			Gradiente 4		
Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %	Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %
0,01	75	25	0,01	75	25
10	40	60	15	30	70
15	30	70	20	20	80
20	20	80	25	0	100
25	0	100	26	75	25
26	75	25	30	75	25
30	75	25			

Os respectivos perfis cromatográficos adquiridos das análises de uma solução padrão na concentração 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos agrotóxicos a partir dos gradientes de eluição 3 e 4 estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 – Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 3. 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina. Para condições de análise, ver tópico 3.5.2.

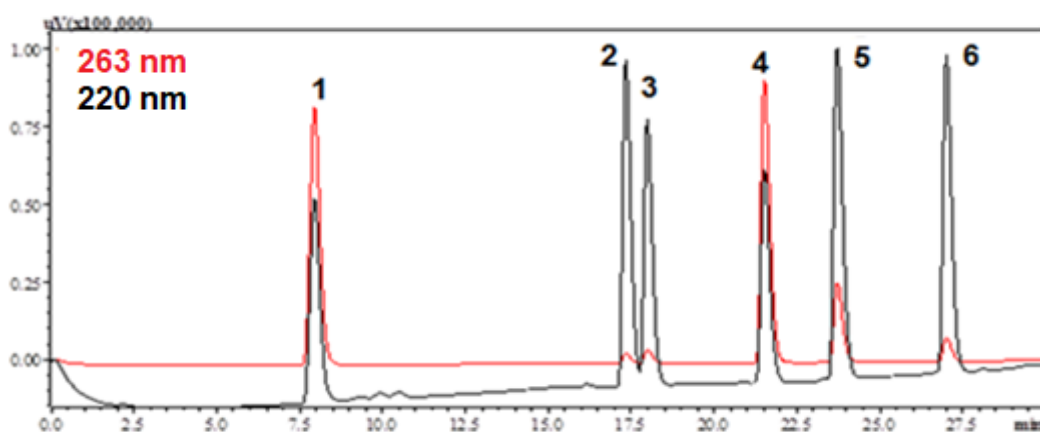
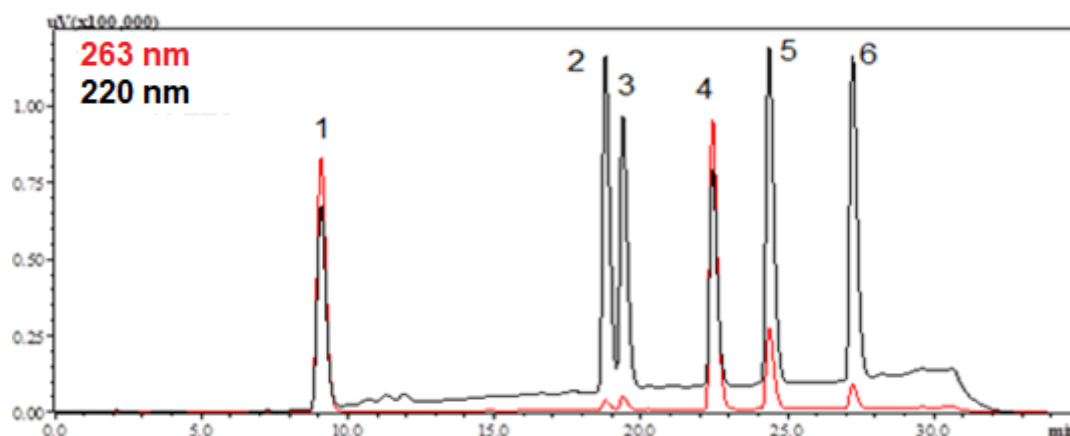


Figura 16 - Cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir do desenvolvimento do gradiente de eluição 4. 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina. Para condições de análise, ver tópico 3.5.2.



Pode-se observar nas Figuras 15 e 16 que os analitos responderam de forma satisfatória aos gradientes de eluição 3 e 4, apresentando boa separação dos picos cromatográficos. No entanto, o gradiente de eluição 3 foi o escolhido para ser utilizado no método, pois, além de separar tebuconazol e epoxiconazol, os picos também foram eluídos da coluna mais rapidamente.

Em seguida, o procedimento da técnica de extração em fase sólida foi otimizado, e os experimentos de bancada foram realizados para a seleção do método mais eficiente no preparo da amostra. Esses procedimentos estão descritos a seguir.

4.3 Otimização do preparo de amostra na técnica SPE

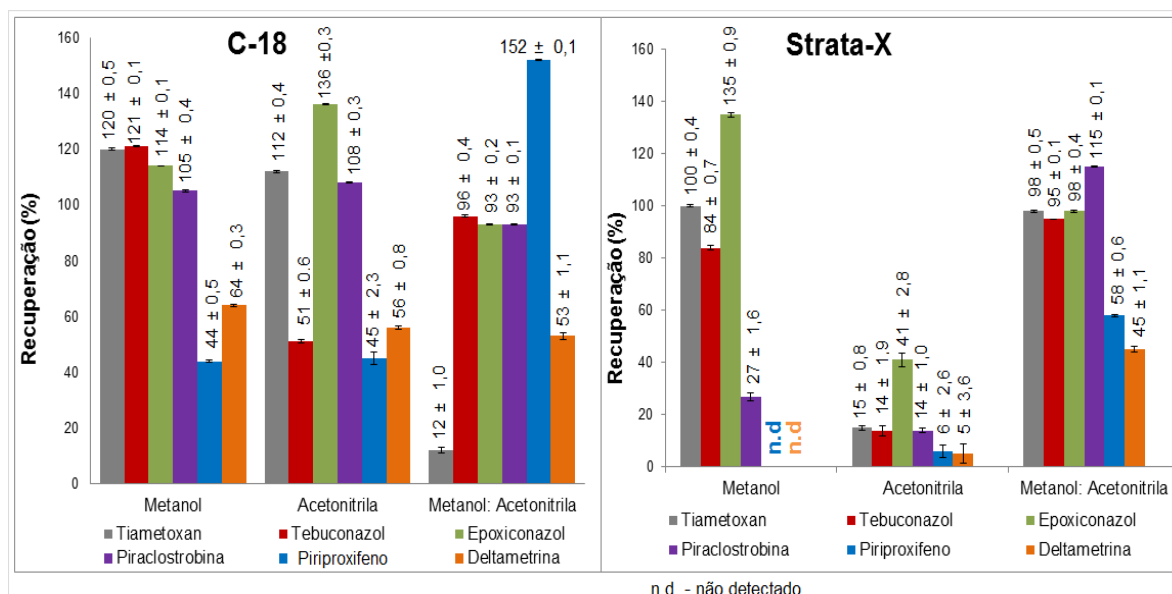
Na análise de agrotóxicos, a depender do tipo de matriz em estudo, a preparação da amostra é um dos passos mais críticos no processo analítico. Sendo incluído nesse pré-tratamento, o isolamento e a pré-concentração dos analitos. Por se tratar de uma das técnicas mais empregadas e com maior eficiência para a pré-concentração de analitos presentes em matrizes aquosas, optou-se por trabalhar com SPE [51].

Para avaliar a eficiência do método na etapa de extração dos agrotóxicos, diversos procedimentos foram testados.

4.3.1 Seleção do adsorvente

Segundo Carvalho *et al.*, 2008, os adsorventes mais usados na SPE para extração de agrotóxicos em matrizes aquosas são: C-18 e os adsorventes poliméricos (baseadas em estireno-divilbenzeno), ambos usados na extração de diversas classes de agrotóxicos [91]. Neste trabalho, para a etapa da pré-concentração dos agrotóxicos, foram testados dois adsorventes, C-18 e Strata-X. Foi usado um nível de fortificação dos agrotóxicos de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, com volume da amostra de 100 mL e volume de eluição de 6 mL utilizando diferentes solventes na eluição. Os resultados estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Eficiência na recuperação dos agrotóxicos em água por SPE, utilizando nível de fortificação de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 100 mL da amostra e volume de eluição de 6 mL.



Observando a Figura 17, verifica-se que o adsorvente Strata-X não proporcionou recuperações satisfatórias para a maioria dos analitos em estudo quando se utilizou como solvente de eluição metanol ou acetonitrila, e somente na mistura dos dois solventes (metanol:acetonitrila) os resultados de

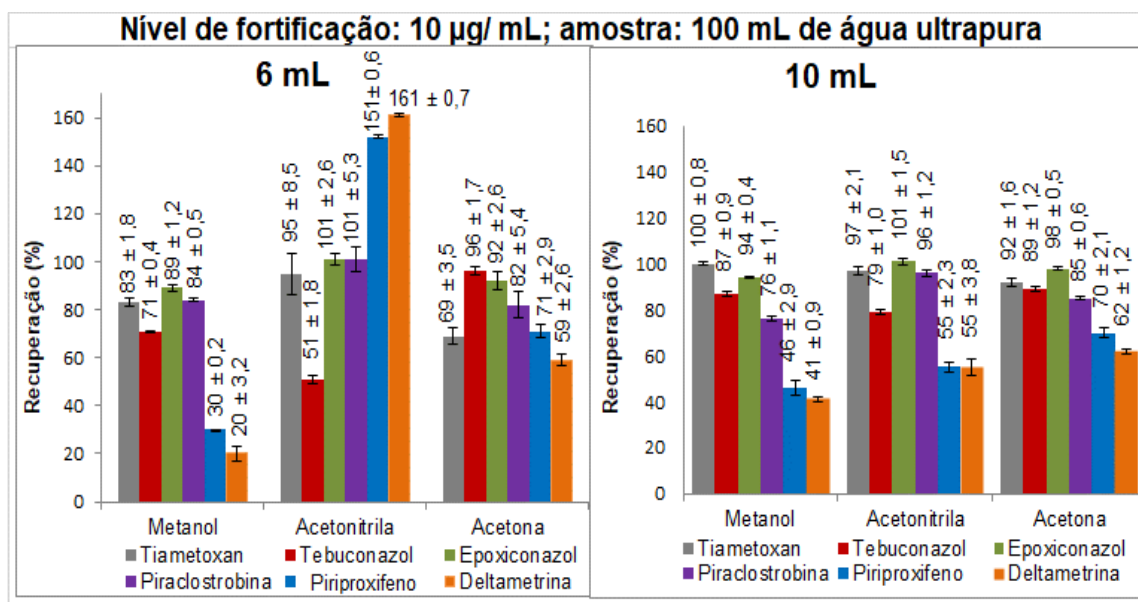
recuperação apresentaram uma melhor faixa, 45 a 115 %. Devido à forte interação dos analitos com a fase estacionária de estireno-divinilbenzeno modificada presente no cartucho Strata-X, é provável que estes tenham ficado retidos à fase sólida do cartucho e em consequência disso, a eluição com os solventes testados não tenha sido tão eficiente. Portanto, foi desconsiderado o seu uso no restante deste estudo.

Também foi testado o adsorvente C-18, cujo mecanismo de retenção ocorre por partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C-18 e C-H dos analitos, o qual os resultados apresentaram uma melhor faixa de recuperação para o metanol (44 a 121 %) e acetonitrila (45 a 136 %). Baseado nesses dados e por se tratar de um adsorvente com menor custo, o adsorvente C-18 foi o selecionado para ser utilizado nas demais etapas do trabalho.

4.3.2 Seleção do volume do solvente na eluição

O volume do eluente influencia no desempenho da eluição dos agrotóxicos [92]. Dessa maneira, foram testados dois volumes de diferentes solventes com o propósito de garantir quantitativamente a eluição dos agrotóxicos. A Figura 18 apresenta a recuperação dos analitos com a variação do volume do solvente de eluição.

Figura 18 - Recuperações obtidas para os agrotóxicos utilizando cartucho C-18 com volumes de 6 e 10 mL dos solventes de eluição testados (metanol, acetonitrila e acetona), nível de fortificação de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 100 mL da amostra.



Avaliando os volumes testados, 6 e 10 mL, observa-se na Figura 18 que os valores de recuperação com o volume de 10 mL quando se fez uso de metanol como solvente de eluição apresentaram a faixa de recuperação de 41 a 100 %. Por sua vez, utilizando como solvente de eluição a acetonitrila, a recuperação variou entre 55 a 101 %.

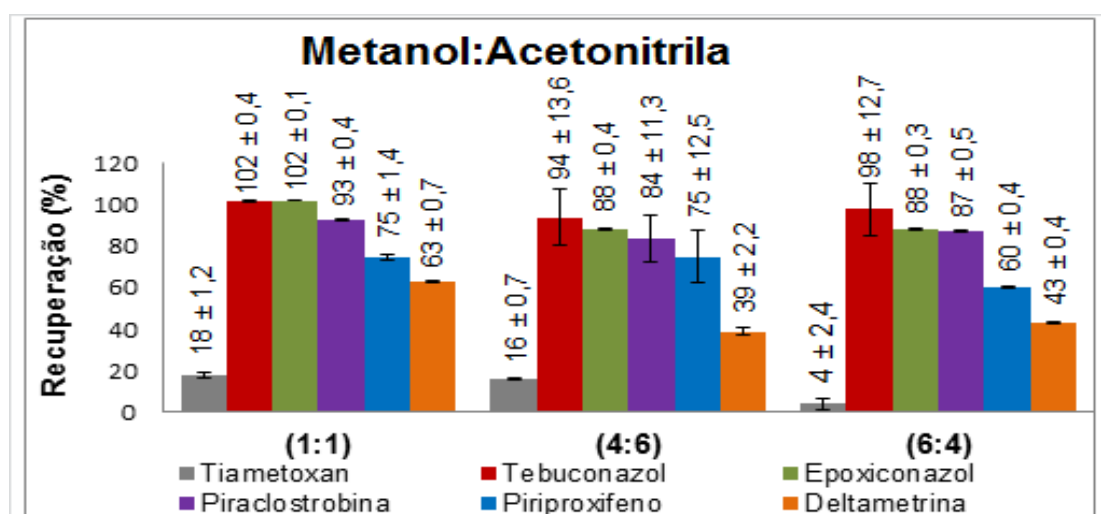
Em seguida, a acetona foi avaliada como solvente de eluição. E pode-se observar que quando comparado com os outros dois solventes testados, metanol e acetonitrila, a mesma apresentou uma faixa de recuperação com melhores resultados, 62 a 98 %. Isso pode ser justificado pelo fato destes compostos serem bastante solúveis neste solvente, como pode ser visto na Tabela 3 (página 13).

Assim, o volume selecionado para eluir quantitativamente os agrotóxicos foi de 10 mL dos solventes testados (metanol, acetonitrila e acetona). Como neste volume, os analitos apresentaram um aumento nos valores de recuperação para todos os solventes testados, ainda não selecionamos neste teste o solvente de eluição.

4.3.3 Seleção da proporção de solventes utilizados na eluição

A fim de obter melhor eficiência no método de extração, foram avaliadas as combinações dos solventes metanol e acetonitrila em diferentes proporções. Utilizando o volume de 10 mL dessa combinação como solvente de eluição, as proporções testadas foram: (1:1, v/v), (4:6, v/v) e (6:4, v/v). Os resultados das recuperações estão expressos na Figura 19.

Figura 19 - Valores de recuperação obtidos com diferentes proporções de solventes na eluição dos agrotóxicos com nível de concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

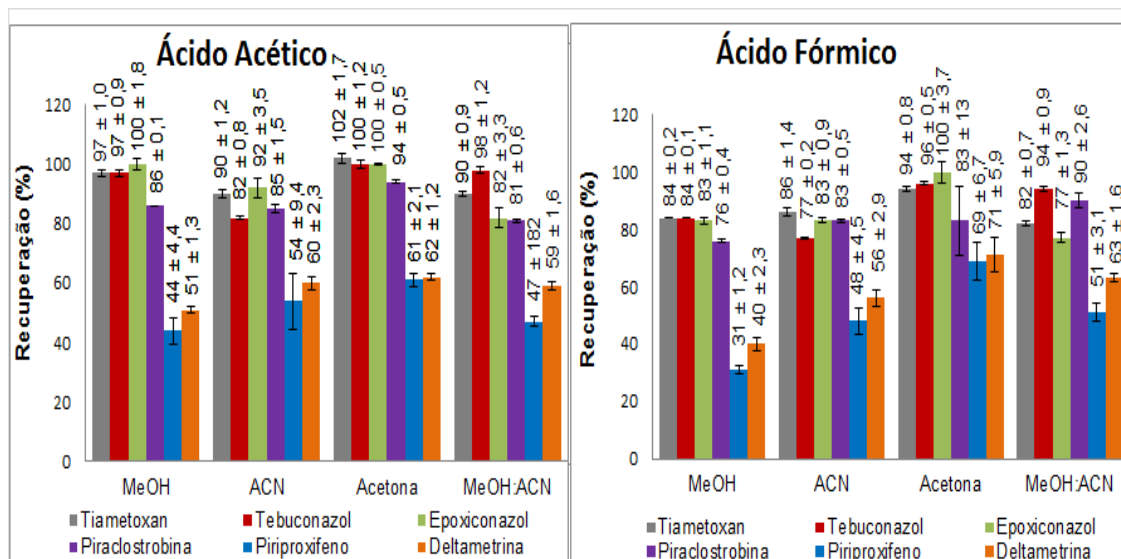


Com os dados obtidos pode-se observar que os valores de recuperação resultantes do uso de 10 mL da combinação de metanol:acetonitrila em diferentes proporções apresentaram uma pequena variação. Sendo que a combinação dos solventes na proporção de 1:1 apresentou um melhor valor, 18 a 102 %. Assim, essa proporção foi selecionada para a realização do próximo teste.

4.3.4 Avaliação do ajuste de pH

Com a definição do adsorvente (C-18) e do volume do solvente de eluição (10 mL), foram testados diferentes solventes de eluição acidificados a pH 5,0 com soluções de ácido acético ($pK_a=4,76$) e ácido fórmico ($pK_a=3,77$). A Figura 20 retrata a recuperação dos analitos com os experimentos realizados.

Figura 20 - Influência da adição de solução de ácido acético e ácido fórmico aos solventes de eluição na eficiência da extração dos agrotóxicos em estudo com nível de concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Onde: MeOH: Metanol; ACN: Acetonitrila;

Comparando as recuperações expressas na Figura 20 com as constantes de acidez apresentadas na Tabela 3 (página 13), percebe-se que para os agrotóxicos com maiores valores de pK_a , piriproxifeno e deltametrina, 6,73 e 4, respectivamente, foram obtidos os menores valores de recuperação. Isto provavelmente aconteceu pelo fato destes compostos apresentarem menor caráter ácido, resultando em menores recuperações em meio ácido. E como os demais compostos em estudo, tiametoxan, tebuconazol, epoxiconazol e piraclostrobina, têm elevado caráter ácido, a utilização de meio também ácido resultou em boas recuperações para estes.

Além disso, como os ácidos acético e fórmico são polares, e os agrotóxicos tiametoxan, tebuconazol, epoxiconazol e piraclostrobina também são polares, isso pode ter resultado nos altos valores de recuperação apresentados por estes.

Assim, a técnica de extração em fase sólida, empregando adsorvente C-18, com 10 mL de acetona acidificado a pH 5,0 com solução de ácido fórmico apresentou resultados aceitáveis para a determinação de agrotóxicos,

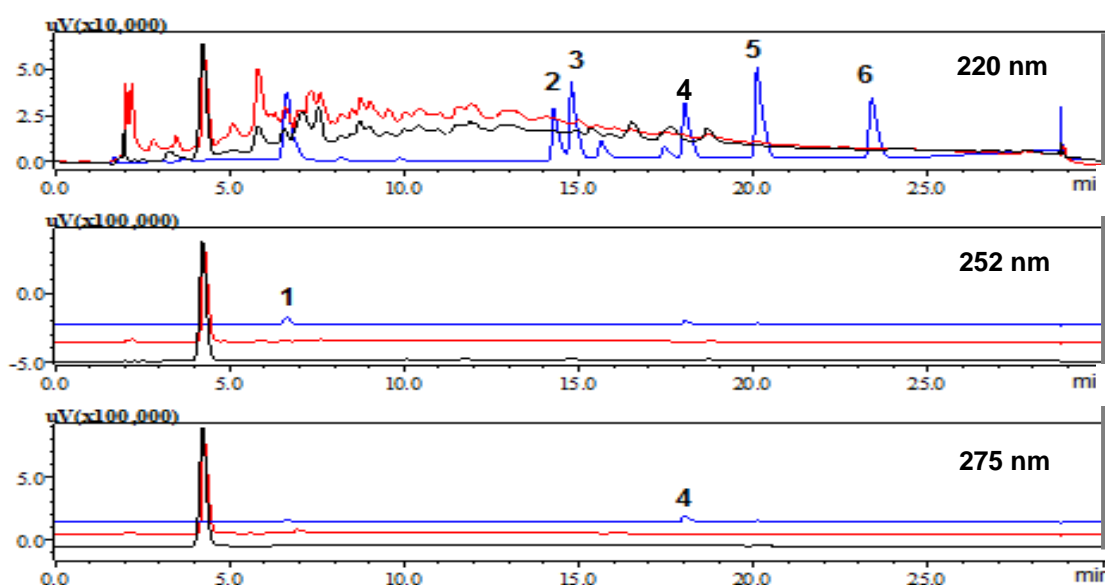
apresentando potencialidade para ser aplicada em amostras de água possivelmente contaminadas por agrotóxicos.

No entanto, nos últimos anos o uso de adsorventes alternativos vem se destacando devido a sua eficiência na extração de compostos orgânicos e por se tratar de uma opção sustentável. Em virtude disso, também foi realizado a otimização utilizando como adsorvente o biocarvão produzido a partir de aguapé.

4.3.5 Otimização empregando o biocarvão de aguapé como adsorvente alternativo para SPE

Inicialmente, a fim de conhecer o perfil cromatográfico obtido com uso do biocarvão de aguapé como adsorvente, foi preparado dois cartuchos de SPE com diferentes massas do biocarvão, 150 e 250 mg, para posterior extração das soluções isentas de agrotóxicos utilizando o volume de 100 mL da amostra e 10 mL de acetona como solvente de eluição. Os respectivos cromatogramas podem ser observados na Figura 21.

Figura 21: Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC UV-Vis/DAD dos brancos com 150 mg (preto) e 250 mg (vermelho) do biocarvão de aguapé e da solução padrão conjunta dos agrotóxicos com concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (azul). 1- Tiametoxan, 2- Tebuconazol, 3- Epoxiconazol, 4- Piraclostrobina, 5- Piriproxifeno, 6- Deltametrina.



Ao comparar os cromatogramas obtidos das soluções em branco utilizando as diferentes massas do biocarvão com a solução padrão na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, nota-se que com o aumento da massa do biocarvão, os picos dos interferentes do adsorvente no início da corrida cromatográfica foram intensificados. No entanto, os extratos da amostra não apresentaram interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados.

A média de recuperação de cada agrotóxico fazendo uso do mesmo procedimento experimental utilizado para o adsorvente biocarvão esta apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Recuperação e coeficiente de variação (CV) dos agrotóxicos em água na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando diferentes massas do biocarvão como adsorvente em SPE.

Agrotóxicos	Massa do adsorvente (mg)	
	Recuperação Média \pm CV (%)	
	250	150
Tiametoxan	$33 \pm 2,9$	$40 \pm 8,2$
Tebuconazol	$74 \pm 2,2$	$80 \pm 0,3$
Epoxiconazol	$85 \pm 1,2$	$89 \pm 8,0$
Piraclostrobina	$77 \pm 2,7$	$80 \pm 3,8$
Piriproxifeno	$72 \pm 7,6$	$70 \pm 4,7$
Deltametrina	$46 \pm 5,2$	$45 \pm 0,9$

De acordo com a Tabela 11, é possível verificar que quando se fez uso de cartuchos contendo menor massa do biocarvão houve um aumento nos valores das recuperações dos analitos. Desta forma, os cartuchos contendo 150 mg do biocarvão foram escolhidos para serem utilizados nos próximos testes da otimização.

Em seguida, a fim de pré-concentrar os analitos e obter melhor sinal para concentrações mais baixas no HPLC, aumentou-se o volume da amostra para 500 mL, sendo este testado em diferentes vazões, 8; 5; 4 e 3 mL min^{-1} . A vazão da amostra na pré-concentração dos analitos foi estudada, a fim de

examinar a interação dos analitos com o material adsorvente. Se a vazão utilizada na solução da amostra for excessivamente alta pode conduzir à retenção incompleta dos analitos, devido ao tempo de contato insuficiente entre o analito e o material adsorvente. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Recuperações e coeficientes de variação (CV) dos agrotóxicos na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg de biocarvão de aguapé como adsorvente em 500 mL da amostra em diferentes vazões.

Agrotóxicos	Vazão da amostra (mL min^{-1})			
	Recuperação Média \pm CV (%)			
	8	5	4	3
Tiametoxan	$25 \pm 1,8$	$59 \pm 3,4$	$38 \pm 2,4$	$49 \pm 2,0$
Tebuconazol	$72 \pm 6,5$	$88 \pm 3,8$	$84 \pm 2,0$	$86 \pm 0,7$
Epoxiconazol	$82 \pm 8,0$	$99 \pm 2,9$	$94 \pm 1,5$	$94 \pm 0,5$
Piraclostrobina	$77 \pm 1,3$	$79 \pm 4,0$	$86 \pm 1,1$	$83 \pm 2,4$
Piriproxifeno	$58 \pm 6,6$	$70 \pm 2,7$	$62 \pm 1,3$	$68 \pm 0,9$
Deltametrina	$33 \pm 8,2$	$41 \pm 6,6$	$36 \pm 0,7$	$40 \pm 4,2$

Analisando a Tabela 12, nota-se que a menor faixa de recuperação, 25 a 82 %, foi obtida com a maior vazão testada, 8 mL/min, isso pode ter acontecido, pelo fato dos analitos não serem retidos por tempo suficiente para interagir com o material adsorvente. E a vazão de 5 mL/min apresentou melhores resultados de recuperação, 41 a 99 %.

Assim, a vazão da transferência da amostra de 5 mL min^{-1} foi a selecionada para ser utilizada na seleção do solvente de eluição, visto que foi possível recuperações satisfatórias para um número maior dos agrotóxicos, tebuconazol, epoxiconazol, piraclostrobina e piriproxifeno.

4.3.5.1 Seleção do solvente de eluição

Na etapa da eluição dos analitos do material da fase sólida, diversos solventes podem ser utilizados, sendo os mais comuns o metanol, a acetona, a

acetonitrila, ou ainda uma mistura deles. O solvente adequado está diretamente relacionado com a polaridade dos compostos extraídos, o ideal é efetuar a eluição com um solvente de polaridade semelhante à dos compostos [93].

Com intuito de verificar as recuperações dos agrotóxicos na extração de 500 mL da amostra com fluxo de 5 mL min^{-1} na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando 150 mg de biocarvão como adsorvente, foram testados nessa etapa alguns solventes puro, a mistura deles e acidificados com ácidos acético ou fórmico [94].

Como observado na Tabela 13, na mistura dos solventes com uma pequena diferença de polaridade, acetonitrila:metanol (1:1 v/v), as recuperações dos quatro agrotóxicos que apresentam de alta a moderada polaridade, tiametoxan, tebuconazol, epoxiconazol e piraclostrobina, encontram-se no intervalo aceitável entre 70 a 120 %. No entanto, os eluentes utilizados não possuem polaridade adequada para extrair o piriproxifeno e a deltametrina, pois estes são apolares.

Assim, a mistura acetonitrila:metanol (1:1 v/v) foi a selecionada para ser utilizada como solvente de eluição no processo da validação tendo em vista que possibilitou recuperações satisfatórias para a maioria dos analitos.

Tabela 13: Recuperações obtidas para os agrotóxicos por SPE utilizando biocarvão como adsorvente em diferentes solventes de eluição utilizando nível de fortificação de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 150 mg de biocarvão de aguapé como adsorvente em 500 mL da amostra.

Solventes de eluição testados	Recuperação Percentual dos Agrotóxicos (%)					
	Tiametoxan	Tebuconazol	Epoxiconazol	Piraclostrobina	Piriproxifeno	Deltametrina
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	$58 \pm 2,0$	$75 \pm 0,7$	$81 \pm 0,5$	$77 \pm 2,4$	$70 \pm 0,9$	$35 \pm 4,2$
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	$59 \pm 3,4$	$74 \pm 4,6$	$80 \pm 2,0$	$71 \pm 2,6$	$48 \pm 5,5$	$29 \pm 5,3$
CH_3OH	$9 \pm 8,2$	$71 \pm 0,3$	$92 \pm 8,1$	$72 \pm 3,8$	$67 \pm 4,7$	$29 \pm 0,9$
$\text{CH}_3\text{OH}:\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ (1:1 v/v)	$95 \pm 0,01$	$78 \pm 1,2$	$86 \pm 3,7$	$81 \pm 0,5$	$55 \pm 4,7$	$28 \pm 3,0$
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$	$41 \pm 2,9$	$82 \pm 2,2$	$86 \pm 1,2$	$103 \pm 2,7$	$68 \pm 7,6$	$35 \pm 5,1$
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{CH}_3\text{COOH}$	$67 \pm 0,4$	$73 \pm 8,8$	$88 \pm 1,3$	$77 \pm 0,4$	$60 \pm 8,2$	$28 \pm 2,0$
$\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COOH}$	$33 \pm 1,6$	$80 \pm 2,0$	$106 \pm 1,2$	$91 \pm 0,5$	$56 \pm 6,3$	$37 \pm 7,3$
$\text{CH}_3\text{OH}:\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (1:1 v/v)	$33 \pm 5,2$	$74 \pm 2,6$	$81 \pm 2,2$	$78 \pm 3,7$	$47 \pm 0,2$	$23 \pm 5,1$
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{C}_3\text{H}_6\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ (1:1 v/v)	$52 \pm 4,2$	$83 \pm 2,1$	$89 \pm 0,2$	$86 \pm 3,5$	$54 \pm 0,03$	$35 \pm 12,5$
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$	$34 \pm 3,0$	$72 \pm 0,5$	$84 \pm 1,4$	$80 \pm 0,2$	$63 \pm 0,2$	$32 \pm 3,3$
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{CH}_2\text{O}_2$	$96 \pm 2,5$	$69 \pm 1,8$	$94 \pm 0,6$	$78 \pm 2,0$	$50 \pm 0,3$	$33 \pm 0,1$
$\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{O}_2$	$48 \pm 0,2$	$74 \pm 1,6$	$104 \pm 0,9$	$75 \pm 3,8$	$64 \pm 0,5$	$35 \pm 1,1$
$\text{CH}_3\text{OH}:\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{CH}_2\text{O}_2$ (1:1 v/v)	$71 \pm 4,9$	$65 \pm 0,8$	$47 \pm 3,7$	$94 \pm 1,5$	$36 \pm 1,2$	$52 \pm 0,3$
$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}:\text{C}_3\text{H}_6\text{O}:\text{CH}_2\text{O}_2$ (1:1 v/v)	$39 \pm 0,5$	$71 \pm 0,1$	$75 \pm 5,3$	$71 \pm 1,6$	$50 \pm 2,1$	$24 \pm 8,7$

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: Acetona; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$: Acetonitrila; CH_3OH : Metanol; CH_3COOH : Ácido Acético; CH_2O_2 : Ácido Fórmico.

4.4 Validação do método analítico

Após a otimização das condições cromatográficas de análise e do método de extração em fase sólida, torna-se necessário à validação, a fim de garantir a confiabilidade desse método. Neste trabalho, os parâmetros avaliados para o processo da validação foram: linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, cujos resultados estão descritos a seguir. [95]

4.4.1 - Linearidade e Sensibilidade

A linearidade do método foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (r^2) das curvas analíticas. As curvas foram preparadas a partir de uma solução padrão conjunta na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila e no extrato da matriz, das quais foram preparadas soluções nas concentrações 0,025; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Depois da análise, as curvas foram construídas a partir da relação entre a concentração e a área de cada analito. As curvas construídas encontram-se na Figura 22. A Tabela 14 mostra as equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2) obtidos a partir das curvas analíticas na matriz e no solvente de cada agrotóxico estudado por HPLC UV-Vis/DAD.

Figura 22 - Curvas analíticas dos agrotóxicos preparados em solvente e na matriz e obtidas pela análise em HPLC UV-Vis/DAD no intervalo de concentração de 0,025 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

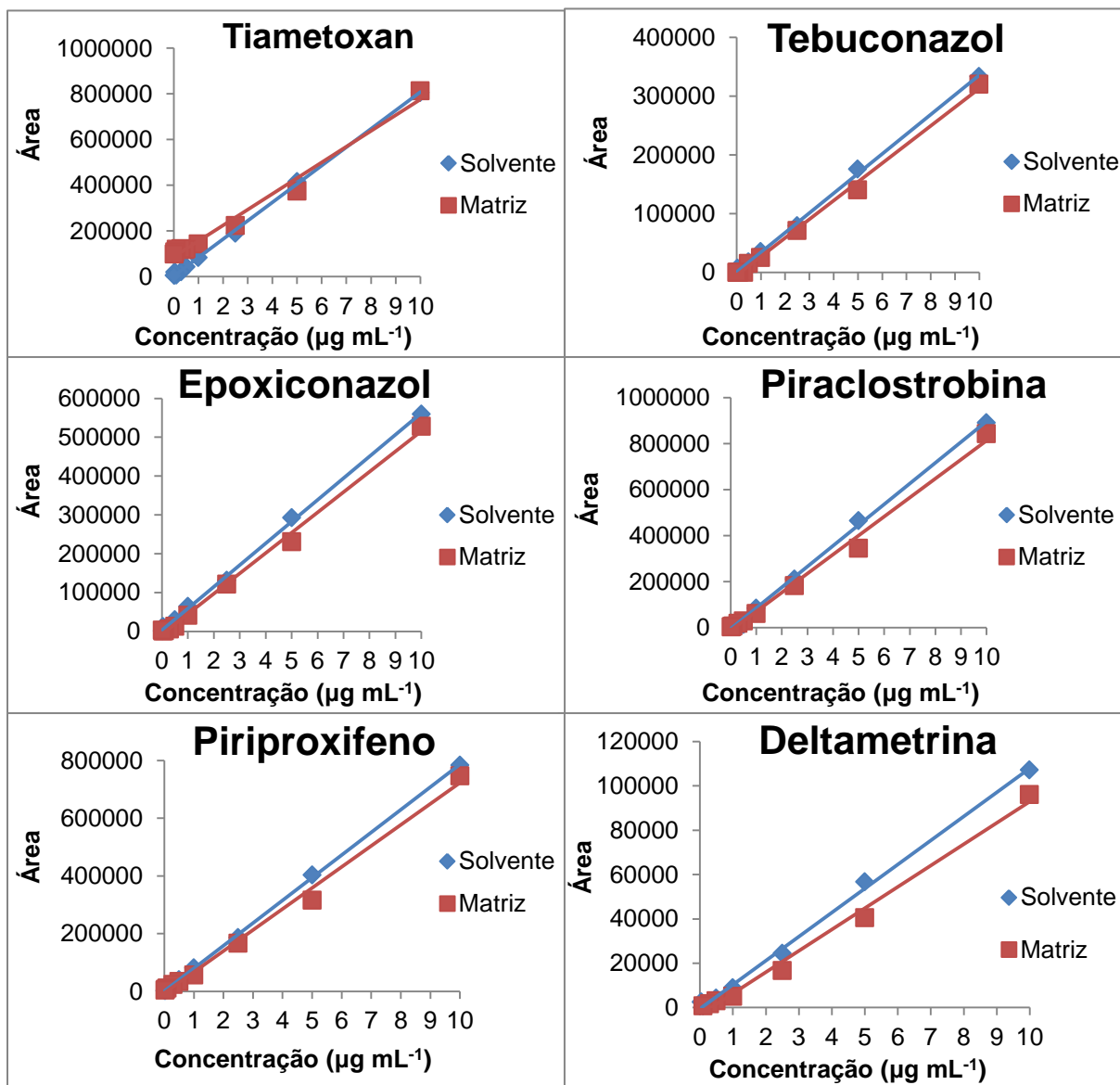


Tabela 14 – Intervalos de concentrações, equações das retas das curvas analíticas dos agrotóxicos estudados no extrato da matriz e no solvente e seus coeficientes de determinação (r^2).

Agrotóxicos	Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Extrato da Matriz		Extrato do Solvente	
		Equação da Reta	r^2	Equação da Reta	r^2
Tiametoxan	0,025 – 10	$y = 68926x + 86723$	0,9832	$y = 80540x + 2646$	0,9991
Tebuconazol	0,05 – 10	$y = 31780x - 4852$	0,9966	$y = 33479x + 1072$	0,9986
Epoxiconazol	0,025 -10	$y = 52410x - 8137,2$	0,9965	$y = 55922x + 2821,2$	0,9988
Piraclostrobina	0,05 – 10	$y = 82444x - 12500$	0,9924	$y = 90206x - 5379,7$	0,9977
Piriproxifeno	0,025 – 10	$y = 72807x - 5590,3$	0,9940	$y = 78475x + 1112,8$	0,9993
Deltametrina	0,1 – 10	$y = 9614,6x - 3218,8$	0,9916	$y = 10840x - 440,4$	0,9977

Os coeficientes de determinação foram superiores a 0,9832, o que indica uma boa resposta linear, de acordo com o determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Nessa Resolução recomenda-se um coeficiente de determinação igual a 0,99, enquanto o Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO) aceita valores acima de 0,90 [25, 67].

A sensibilidade do método foi determinada usando os coeficientes angulares das curvas analíticas dos agrotóxicos analisados por HPLC UV-Vis/DAD. Através das equações das retas, pode-se observar que o agrotóxico mais sensível ao método foi a piraclostrobina, pois este apresentou um maior coeficiente angular, enquanto que a deltametrina foi o menos sensível [70].

4.4.2 – Seletividade não específica (efeito matriz)

Este parâmetro avalia a interferência dos componentes da matriz no desempenho do sinal cromatográfico dos analitos, podendo causar o aumento ou diminuição da resposta cromatográfica. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. [67]

A seletividade foi avaliada comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira preparada no extrato da matriz e a segunda no solvente (acetonitrila). Quando a razão entre os dois coeficientes angulares for igual a 1, significa que nenhum efeito de matriz foi observado, portanto, o método é seletivo, quando for superior a 1 o efeito matriz é positivo, e quando for inferior a 1 o efeito matriz é negativo [96].

A Tabela 15 mostra a razão entre os coeficientes angulares das curvas no extrato da matriz e no solvente.

Tabela 15: Razão dos coeficientes angulares das curvas no extrato da matriz e no solvente para os agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	RCA
Tiametoxan	0,85
Tebuconazol	0,95
Epoxiconazol	0,94
Piraclostrobina	0,92
Piriproxifeno	0,93
Deltametrina	0,88

Os intervalos de concentração retratados na Tabela 15 foram definidos de acordo com a melhor linearidade das duas curvas e considerando os LMR dos agrotóxicos em água para consumo humano (ver Tabela 1).

Portanto, o teste realizado demonstrou que ocorreu efeito negativo para todos os agrotóxicos estudados, onde os valores podem ser observados através das razões dos coeficientes angulares (RCA) expressos na Tabela 15. Este comportamento é justificado, visto que quando os coeficientes angulares no extrato da matriz são menores do que os coeficientes angulares no solvente puro o efeito da matriz pode ser negativo [97, 98].

4.4.3 Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada através dos valores de recuperação obtidos a partir das extrações em fase sólida realizadas em três níveis de concentração para cada agrotóxico e em triplicata para cada nível, utilizando o biocarvão como adsorvente.

A Tabela 16 exhibe as recuperações e os coeficientes de variação em 3 níveis de concentração dos agrotóxicos estudados. Para os agrotóxicos

tiametoxan, epoxiconazol, tebuconazol e piraclostrobina, o método foi aplicado nas concentrações 0,3; 0,6 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para os agrotóxicos deltametrina e piriproxifeno, em virtude dos baixos valores de recuperação obtidos no nível de fortificação 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as concentrações para estes agrotóxicos foram: 0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 16: Resultados de recuperação média (%) e coeficientes de variação (CV) para os três níveis de fortificação testados em triplicatas ($n = 3$).

Agrotóxicos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação Média (%)	CV (%)
Tiametoxan	0,3	103,1	8,0
	0,6	120,7	10,7
	1,0	70,6	5,7
Tebuconazol	0,3	83,8	3,3
	0,6	120,8	0,7
	1,0	87,9	2,1
Epoxiconazol	0,3	79,4	2,3
	0,6	110,2	7,5
	1,0	93,6	0,6
Piraclostrobina	0,3	75,3	3,2
	0,6	110,5	1,0
	1,0	91,5	3,0
Piriproxifeno	0,3	60,3	0,8
	0,5	82,9	1,7
	0,8	96,7	1,3
	1,0	118,6	1,5
Deltametrina	0,3	43,7	1,6
	0,5	71,5	4,4
	0,8	114,2	3,9
	1,0	122,5	1,1

Para análise de resíduos de agrotóxicos, a literatura considera um método analítico como sendo eficiente quando a recuperação do analito encontra-se no intervalo aceitável entre 70 - 120 %, e o coeficiente de variação (precisão) entre as amostras não deve ultrapassar 20 % [68]. Observando a Tabela 16, percebe-se que para os agrotóxicos tiametoxan, tebuconazol, epoxiconazol e piraclostrobina o método desenvolvido mostrou-se exato até o nível de

concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, com valores de recuperações entre 70,6% e 120,8%. Enquanto que para o piriproxifeno e deltametrina, só foi possível observar uma boa exatidão até o nível $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde os valores de recuperação ficaram entre 71,5% e 122,5%.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). Sendo que a precisão intermediária foi verificada na concentração de $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde os ensaios foram realizados em 3 dias diferentes e consecutivos para verificar se o método desenvolvido apresenta o mesmo desempenho quando alguma condição é alterada. A Tabela 16 apresenta os valores encontrados para as análises de repetibilidade, e a Tabela 17 os valores obtidos com os testes de precisão intermediária, ambos os resultados foram expressos em função dos coeficientes de variação.

Tabela 17: Resultados de coeficientes de variação (CV) para teste de precisão intermediária.

Agrotóxicos	CV (%)
Tiametoxan	4,8
Tebuconazol	3,2
Epoxiconazol	4,5
Piraclostrobina	4,7
Piriproxifeno	2,3
Deltametrina	4,6

Para todos os compostos analisados os valores dos coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermediária foram inferiores a 20%, conforme definido pela literatura [68], indicando que o método desenvolvido é preciso.

4.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi aplicado o método baseado em parâmetros da curva analítica. Neste método, o LD e o LQ podem ser expressos utilizando as seguintes equações:

$$LD = 3 \times \frac{s}{a}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta e a é o coeficiente angular da curva analítica [99].

As estimativas do desvio padrão (s) foram calculadas empregando as respostas obtidas nas menores concentrações do ensaio de exatidão, enquanto que os coeficientes angulares utilizados foram obtidos a partir das equações da reta dos agrotóxicos preparados nos extratos da matriz no estudo da seletividade do método. Os valores dos LD e LQ obtidos estão expressos na Tabela 18.

Tabela 18: Limite de detecção e quantificação dos agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	Limite de Detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Tiametoxan	0,03	0,1	0,0006*
Tebuconazol	0,04	0,1	0,18**
Epoxiconazol	0,01	0,05	-
Piraclostrobina	0,01	0,05	-
Piriproxifeno	0,01	0,04	0,3***
Deltametrina	0,08	0,3	-

LMR: Limite Máximo de Resíduo. *EPA; **Portaria MS N° 2914; ***OMS.

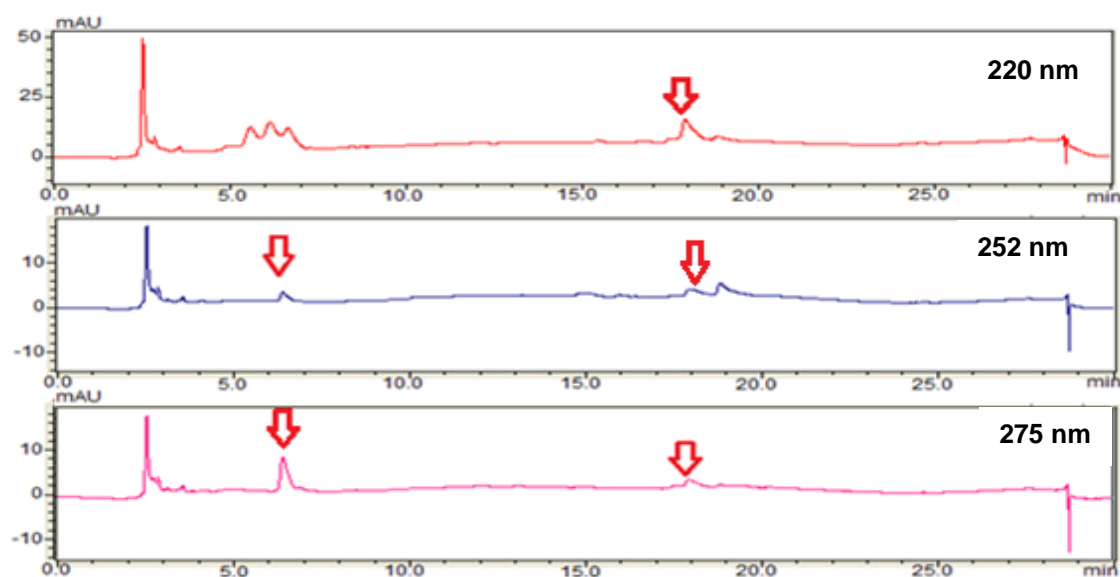
De acordo com os valores apresentados na Tabela 18, pode-se observar que os limites de detecção variaram entre 0,01 e 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os limites de quantificação 0,04 e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de LD e LQ obtidos podem ser considerados satisfatórios quando comparados com os LMR estabelecidos em água para consumo humano, com exceção do agrotóxico tiametoxan, visto que seus valores de LD e LQ estão acima do valor máximo permitido na legislação da Agência de Proteção Ambiental Americana.

4.5 Aplicação do método em amostra real

A região do Baixo São Francisco foi selecionada para o estudo por ser um ambiente propício à contaminação dos recursos hídricos, visto que nessa região é alta a produção de arroz irrigado e, este exige a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos.

Analizando as amostras de água do cultivo de arroz irrigado, nas condições estabelecidas pelo método, foi verificado a presença de 2 dos agrotóxicos em estudo: Tiametoxan e Piraclostrobina com concentrações de 0,21 e 0,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A Figura 23 mostra o cromatograma do extrato da amostra, onde é possível observar a presença dos agrotóxicos identificados, Tiametoxan (6,42 nm) e Piraclostrobina (17,92 nm).

Figura 23: Cromatograma obtido por HPLC UV-Vis/DAD do extrato da amostra de água do cultivo de arroz irrigado.



5 CONCLUSÃO

O método proposto para a determinação simultânea dos agrotóxicos deltametrina, epoxiconazol, piraclostrobina, piriproxifeno, tebuconazol e tiametoxan utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico mostrou-se eficiente na definição e na separação dos picos cromatográficos.

A técnica de extração em fase sólida apresentou resultados aceitáveis para a determinação de agrotóxicos de diferentes grupos químicos. Portanto, o método proposto por SPE, empregando adsorvente C-18, com 10 mL de acetona acidificado a pH 5,0 com solução de ácido fórmico mostrou-se satisfatória e eficaz, apresentando potencialidade para ser aplicada em amostras de água possivelmente contaminadas por agrotóxicos.

No entanto, o método proposto por SPE, empregando biocarvão de aguapé como adsorvente, com 10 mL de metanol:acetonitrila (1:1 v/v) apresentou valores de recuperação entre $70 \pm 0,7\%$ a $122 \pm 10,7\%$ para os níveis de concentração 0,3 a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando-se um método promissor para a validação. Além de que contribui para o uso de material sustentável, podendo substituir adsorventes de alto custo.

Os parâmetros de validação estudados apresentaram resultados satisfatórios, permitindo boa linearidade, sensibilidade e eficiência do método desenvolvido para determinação dos agrotóxicos deltametrina, epoxiconazol, piraclostrobina, piriproxifeno, tebuconazol e tiametoxan em água, aplicando a técnica de extração em fase sólida (SPE) e análise por HPLC UV-VIS/DAD.

Assim, o método validado se mostrou eficiente, apresentando potencialidade para ser aplicado em amostras de água possivelmente contaminadas por agrotóxicos.

6 REFERÊNCIAS

- [1] MMA: Ministério do meio ambiente, 2007. <https://www.mma.gov.br>. (Acessado em: dezembro de 2016)
- [2] EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Arroz/ArrozIrrigadoBrasi.htm>>. (Acessado em: maio 2016).
- [3] Kustera, M.; Aldaa, M. J. L.; Barataa, C.; D. Raldúab, D.; Barceló, D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2008, 75, 390-401.
- [4] Bapata, G.; Labadea, C.; Chaudharia, A.; Zinjarde, S. Silica nanoparticle based techniques for extraction, detection, and degradation of pesticides. *Advances in Colloid, Interface Science*, 2016, 237, 1–14.
- [5] Veiga, Marcelo Motta. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Agricultura*, 2007, 379, 145-152.
- [6] Franz, A.; Link, D. Um olhar sobre a utilização de agrotóxicos no município de Novo Barreiro/RS, através do projeto de educação ambiental, aplicado nas séries finais do ensino fundamental na escola municipal de ensino fundamental Zeferino Brasil. *Revista Monografias Ambientais*, 2011, 4, 672-695.
- [7] BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.html>> Acessado em: julho de 2017.
- [8] BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf> Acessado em: Dezembro de 2016.

- [9] Lanças, F. M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.
- [10] Borges, K.B.; Figueiredo, E.C.; Queiroz, M.E.C. Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos, 1º ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2015, 2-8, 62-79.
- [11] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: SP: UNICAMP, 2006.
- [12] Neto, A. A. O. (Org.). A cultura do arroz. Brasília: CONAB, 2015.
- [13] Rico, A.; Sabater, C.; Castillo. M. Á. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 127, 222-229.
- [14] MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Arroz. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. (Acessado em: novembro 2016).
- [15] IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaultta b.shtml>. (Acessado em: agosto de 2016).
- [16] Sudhir-Yadava; Evangelistab, G.; Faronilob, J.; Humphreysb, E.; et al. Establishment method effects on crop performance and water productivity of irrigated rice in the tropics. *Field Crops Research*, 2014,166, 112-127.
- [17] Andrade, M. H.; Souza, C. F.; Varallo, A. C. T.; Peres, J. G. Impactos da produção do arroz inundado na qualidade da água do rio Paraíba do Sul-trecho Taubaté, SP, Brasil. *Revista Ambiente & Água, Taubaté*, 2010, 5, 114-133.
- [18] CODEVASF. <https://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/codevasf-projeta-crescimento-da-producao-de-arroz-em-perimetros-irrigados-de-sergipe> (Acessado em: janeiro de 2017).
- [19] Neto, A. A. O. Compêndio de Estudos Conab – Perspectivas de diversificação e de investimento na produção de arroz- trigo- feijão. Brasília: Conab, 2016, v.1. Disponível em: <http://www.conab.gov.br> (Acessado em setembro de 2016).

- [20] Getirana, A. C. V.; Azevedo, J.P.S.; Magalhães, P.C. Conflitos pelo uso da água no setor agrícola no norte fluminense (i): propostas de soluções e análises através de programação linear. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, Porto Alegre, 2007, 12, 27-38.
- [21] SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de arroz irrigado. *Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil*. Balneário Camboriú: Elf: Editora e Indústria Gráfica LTDA, 2014.
- [22] Sangoi, L.; Bianchet, P.; Ernani, P. R.; Silva, P. R. F. D.; et al. A drenagem do solo no perfilhamento não estimula o desenvolvimento do sistema radicular do arroz irrigado cultivado no sistema pré-germinado. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2008, 38, 77-83.
- [23] Stone, L. F. *Eficiência do uso da água na cultura do arroz irrigado*. Embrapa Arroz e Feijão, Goiás, 2005.
- [24] Dornelles S. H. B.; Sanchotene, D. M.; Macedo, L. C. P.; Rodrigues, S. N.; et al. Controle pós-tardio de angiquinho *Aeschynomene Denticulata* na cultura do arroz. *Vivências*, 2014, 10,19, 42-49.
- [25] ANVISA: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas>. (Acessado em: setembro 2016).
- [26] Montemurro, M.; Siano, G. G.; Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C. Automatic generation of photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data for the highly selective determination of azinphos-methyl in fruit juices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 239, 397-404.
- [27] Santos, T. É. S.; Silva, R. S.; Jara, C. C.; Eguiluz, K. I. B.; Salazar-Banda, G. R. The influence of the synthesis method of Ti/RuO₂ electrodes on their stability and catalytic activity for electrochemical oxidation of the pesticide carbaryl. *Materials Chemistry and Physics*, 2014. 148, 1, 39-47.
- [28] Codex Alimentarius. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/glossary/en/> (acessado em: setembro de 2016).
- [29] BRASIL. Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

- [30] IAE; Instituto de economia agrícola. Defensivos Agrícolas: em 2014, faturamento do segmento foi o destaque. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13679>. (Acessado em: abril de 2016).
- [31] Baird, C.; Cann, M.; Química Ambiental, 4^o ed.; Bookman: Porto Alegre, 2011, 437-486.
- [32] Fenik, J.; Tankiewicz, M.; Biziuk, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 814-826.
- [33] Giavini, E.; Menegola, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?. *Toxicology Letters*, 2010, 198, 106-111.
- [34] Han, W.; Zhong, C.; Liang, L.; Sun, Y.; et al. Electrochemical degradation of triazole fungicides in aqueous solution using TiO₂-NTs/SnO₂-Sb/PbO₂ anode: Experimental and DFT studies. *Electrochimica Acta*, 2014, 130, 179-186.
- [35] Jaffer, A.; Protopopoff, N.; Mosha, F. W.; Malone, D.; et al. Evaluating the sterilizing effect of pyriproxyfen treated mosquito nets against *Anopheles gambiae* at different blood-feeding intervals. *Acta Tropica*, 2015, 150, 131-135.
- [36] Orientação Técnica. <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Orientacao%20Tecnica%20Pyriproxyfen.pdf>. (Acessado em: setembro, 2016).
- [37] Debona, D.; Nascimento, K.J.T.; Gomes, J.G.O.; C.E. Aucique-Perez, C.E.; Rodrigues, F.A. Physiological changes promoted by a strobilurin fungicide in the rice-Bipolaris oryzae interaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 130, 8-16.
- [38] Lia, D.; Liua, M.; Yanga, Y.; Shib, H.; Zhoub, J.; Hea, D. Strong lethality and teratogenicity of strobilurins on *Xenopus tropicalis* embryos: Basing on ten agricultural fungicides. *Environmental Pollution*, 2016, 208, 868-874.

- [39] Li, L.; Li, M.; Chi, H.; Yang, J.; Li, Z.; Liu, C. Discovery of flufenoxystrobin: Novel fluorine-containing strobilurin fungicide and acaricide. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2016, 173-180.
- [40] Jovanov, P.; Guzsványb, V.; Lazićc, S.; Frankod, M.; et al. Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 40, 106-113.
- [41] Goulson, D.; Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 2013, 50, 977-987.
- [42] Li, Z.; Niea, J.; Luc, Z.; Xied, H.; et al. Cumulative risk assessment of the exposure to pyrethroids through fruits consumption in China—Based on a 3-year investigation. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 96, 234-243.
- [43] Santos, M. D.; Areas, M. A.; Reyes, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 2008, 18, 339-349.
- [44] Truong, L.; Gonnerman, G.; Simonich, M. T.; Tanguay, R. L. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, 2016, 218, 1089-1093.
- [45] EPA-United States Environmental Protection Agency. Thiametozan PesticideTolerance 12/00, 2000. http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/propetamphos-zetacyperm/thiamethoxam/thiameth_tol_1200.html
- [46] Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. 3. ed. Ginebra: OMS, 2006.
- [47] Primel, E. G.; Zanella, R.; Kurz, M. H. S.; Gonçalves, F. F.; et al. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova*, 2005, 28, 605-609.
- [48] IUPAC: Foodprint pesticide. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac>. (Acessado em maio de 2015).
- [49] Barceló, D.; Hennion, M. C. *Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water (BOOK REPRINT)*. Elsevier Science, 1997, 19.

- [50] *The PubChem Project*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (acessado em Agosto de 2016)
- [51] Lanças, F.M. *Extração em fase sólida – SPE*. São Carlos, SP: RIMA, 2004, 1- 35.
- [52] Lucci, P.; Pacetti, D.; Núñez, O.; Frega, N. G. Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis. *Chromatography: The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. InTech, 2012, 127-164.
- [53] Camel, V. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*. 2003, 58, 1177-1233.
- [54] Fernandes, A. N.; Giovanela, M.; Almeida, C. A.; Esteves, V. I.; et al. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. *Química Nova*, 2011, 34, 9, 1526-1533.
- [55] Chen, L.; Huang, X. Preparation of a polymeric ionic liquid-based adsorbent for stir cake sorptive extraction of preservatives in orange juices and tea drinks. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 916, 33-41.
- [56] Gonçalves Jr, A. C. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. *Inclusão Social*, 2013, 6(2).
- [57] Mandal, A.; Singh, N.; Purakayastha, T. J. Characterization of pesticide sorption behaviour of slow pyrolysis biochars as low cost adsorbent for atrazine and imidacloprid removal. *Science of the Total Environment*, 2017, 577, 376-385.
- [58] Zhao, X.; Ouyang, W.; Hao, F.; Lin, C; et al. Properties comparison of biochars from corn straw with different pretreatment and sorption behaviour of atrazine. *Bioresource Technology*, 2013, 147, 338-344.
- [59] Taha, S. M.; Amer, M. E.; Elmarsafy, A. E.; Elkady, M. Y. Adsorption of 15 different pesticides on untreated and phosphoric acid treated biochar and charcoal from water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2014, 2, 2013-2025.

- [60] Lm, J. K.; Boateng, L. K.; Flora, J. R.; Her, N.; et al. Enhanced ultrasonic degradation of acetaminophen and naproxen in the presence of powdered activated carbon and biochar adsorbents. *Separation and Purification Technology*, 2014, 123, 96-105.
- [61] Li, F.; Feng, D.; Deng, H.; Yu, H.; Ge, C. Effects of biochars prepared from cassava dregs on sorption behavior of ciprofloxacin. *Procedia Environmental Sciences*, 2016, 31, 795-803.
- [62] Qambrani, N. A.; Rahman, M. M.; Won, S.; Shim, S.; Ra, C. Biochar properties and eco-friendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 79, 255-273.
- [63] Antunes, E.; Schumann, J.; Brodie, G.; Jacob, M. V.; Schneider, P. A. Biochar produced from biosolids using a single-mode microwave: Characterisation and its potential for phosphorus removal. *Journal of Environmental Management*, 2017, 196, 119-126.
- [64] Zheng, W.; Guo, M.; Chow, T.; Bennett, D. N.; Rajagopalan, N. Sorption properties of greenwaste biochar for two triazine pesticides. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 181, 1, 121-126.
- [65] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dorlan, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3 ed. EUA: Editora John Wiley & Sons, 2010.
- [66] Płonka, M.; Walorczyk, S.; Miszczyk, M. Chromatographic methods for the determination of active substances and characterization of their impurities in pesticide formulations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 85, 67-80.
- [67] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ–CGCRE–008*, Revisão 03, Brasília, 2010, 20.
- [68] SANCO, Commission of the European Communities. Document n° Sanco/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Uppsala, Suécia, 2014.

- [69] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em método os cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 2004, 27, 771-780.
- [70] Paschoal, J. A. R., Rath, S., Airoidi, F. P. D. S., & Reyes, F. G. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, 2008, 31, 1190-1198.
- [71] Ouertani, R.; El Atrache, L. L.; Hamida, N. B. Chemometrically assisted optimization and validation of reversed phase liquid chromatography method for the analysis of carbamates pesticides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2016, 154, 38-44.
- [72] Cardoso, M. H. W. M.; Gouvêa, A. V.; Nóbrega, A. W. D.; Abrantes, S. D. M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2010, 30, 63-72.
- [73] Araújo, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877, 2224-2234.
- [74] Ribeiro, F. A. D. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R. D.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, 2008, 31, 1, 164-171.
- [75] Shi, Z.; Hu, J.; Li, Q.; Zhang, S.; Liang, Y.; Zhang, H. Graphene based solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for carbamate pesticides analysis in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1355, 219-227.
- [76] Papadakis, E. N.; Vryzas, Z.; Kotopoulou, A.; Kintzikoglou, K.; et al. A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 116, 1-9.
- [77] Ma, J.; Lu, X.; Xia, Y.; Yan, F. Determination of pyrazole and pyrrole pesticides in environmental water samples by solid-phase extraction using

multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 2015, 53, 380-384.

[78] Hao, L.; Liu, X.; J. Wang, J.; Wang, C.; et al. Use of ZIF-8-derived nanoporous carbon as the adsorbent for the solid phase extraction of carbamate pesticides prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Talanta*, 2015, 142, 104-109.

[79] Olivo, V. E.; Tansini, A.; Carasek, F.; Cordenuzzi, D.; et al. Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. *Revista Ambiente & Água*, 2015, 10, 286-297.

[80] Mekonen, S.; Argaw, R.; Simaneseew, A.; Houbraken, M.; et al. Pesticide residues in drinking water and associated risk to consumers in Ethiopia. *Chemosphere*, 2016, 162, 252-260.

[81] Rodríguez-González, N.; Beceiro-González, E.; González-Castro, M. J.; Alpendurada, M. F. On-line solid-phase extraction method for determination of triazine herbicides and degradation products in seawater by ultra-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1470, 33-41.

[82] Vieira, D. C.; Noldin, J. A.; Deschamps, F. C.; Resgalla, C. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. *Chemosphere*, 2016, 162, 48-54.

[83] Ouyang, W.; Cai, G.; Tysklind, M.; Yang, W.; et al. Temporal-spatial patterns of three types of pesticide loadings in a middle-high latitude agricultural watershed. *Water Research*, 2017, 122, 377-386.

[84] Santos, R. A. C. Desenvolvimento de Método para Determinação de Agrotóxicos (Perturbadores Endócrinos) em Água. Dissertação de mestrado. UFS, Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE, 2016.

[85] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. High-Performance gradient elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model. John Wiley & Sons, 2007.

- [86] Silva, C. G. A. D.; Collins, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, 2011, 34, 665-676.
- [87] Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Guerrero, M. I. C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26, 466-485.
- [88] PHENOMENEX. <https://www.phenomenex.com/>. (Acessado em: setembro de 2016).
- [89] Issufo, C. H. N.; Calu, J.; Lopes, N. P. R.; Nazareth, T. S. Métodos Cromatográficos. 2009.
- [90] Harris, D.C. Análise Química Quantitativa. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro, LTC, 2008.
- [91] Carvalho, J. J.; Jerónimo, P. C. A.; Gonçalves, C.; Alpendurada, M. F. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392, 955-968.
- [92] Zhang, A.; Zhou, L.; Zhang, P.; Fan, X.; et al. Bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the determination of organophosphorus pesticides in water samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 2012, 45, 1971-1979.
- [93] Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2010, 2, 1, 13-25.
- [94] Santos, A. B. D.; Souza, N. C. D.; Nascimento, R. F. D.; Alves, J. A. C.; Pessoa, G. D. P.; Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. *Química Nova*, 2012, 35, 5, 968-973.
- [95] Leite, F. Validação em análise química, 5ª ed. Átomo, 2008.

- [96] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, 2009, 32, 987-995.
- [97] Sousa, F. A.; Costa, A. I. G.; Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; et al. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. *Food Chemistry*, 2012, 135, 1, 179-185.
- [98] Giacinti, G.; Raynaud, C.; Capblancq, S.; Simon, V. Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1483, 8-19.
- [99] Aragão, N. M. D.; Veloso, M. C. D. C.; Andrade, J. B. D. Validação de métodos cromatográficos de análise-um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. *Química Nova*, 2009, 32, 2476-2481.
- [100] Meyer, V. R.; Practical higt-performance liquid chromatograpy, 4° ed. Wiley, 2004.